

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIAN RICHARD SCHENBERGER SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA NAD SINTETASE (NADE2) DE *Herbaspirillum
seropedicae*

CURITIBA

2016

ADRIAN RICHARD SCHENBERGER SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA NAD SINTETASE (NADE2) DE *Herbaspirillum seropedicae*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica), no Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo

Coorientadores: Dra. Vivian Rotuno Moure e Prof. Dr. Marco A. S. de Oliveira

CURITIBA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

ADRIAN RICHARD SCHENBERGER SANTOS

Caracterização da enzima NAD sintetase (NadE2) de *Herbaspirillum seropedicae*


Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.ª Dr.ª Ana Claudia Bonatto
Departamento de Genética – UFPR



Prof.ª Dr.ª Carolina Weigert Galvão
Departamento de Biologia Estrutural Molecular e Genética, UEPG

Curitiba, 21 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor Luciano Fernandes Huergo, obrigado por sua disponibilidade irrestrita, apoio, orientação, pelo exemplo de profissional dedicado, de orientador exigente e apaixonado pelo que faz. Obrigado por sua paciência em me ensinar a cumprir prazos e a ter esperança em cada resultado promissor.

Ao Professor Doutor Marco Aurélio Schüller de Oliveira, obrigado por me coorientar com a mesma paixão que executa seus próprios experimentos, discutir meus dados por horas quando eu estava com dúvidas e me dar dicas importantes na bancada. Obrigado pelo exemplo de profissional criativo, crítico e esforçado.

À minha coorientadora Doutora Vivian Rotuno Moure, obrigado por sua disponibilidade e atenção até mesmo naquelas horas mais difíceis. Obrigado por me ensinar através do seu exemplo de dedicação a nunca desistir. Obrigado pelas horas de conversa entre um experimento e outro quando eu não acreditava que iria conseguir.

À Professora Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens que me apoia desde a graduação. Muito obrigado pela oportunidade de continuar meu projeto de iniciação científica quando estive sem bolsa, e um agradecimento ainda maior pela chance de poder fazer meu estágio de graduação no grupo, que me abriu portas e me mostrou que eu poderia ir além. Não teria chegado até aqui sem sua ajuda. Obrigado pelas sugestões úteis ao projeto de Mestrado e a correção do relatório, tudo foi muito bem-vindo.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ciências bioquímica, pelo conhecimento compartilhado durante as disciplinas específicas, de seminário de tese e reunião de grupo.

Aos coordenadores que estiveram à frente do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular durante o período da minha titulação e à Dona Marilza pela colaboração dispensada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

À Lucinéia, à Dona Rose Prado e ao Valter, pela generosidade, competência e carinho.

Aos colegas de laboratório Ana Paula, Carol, Karina, Mayara, Vânia, Vanessa, Rafa, Rocío, Leilane, Paloma, Thiago, Marcelo, Fernanda, Heloísa, Esther e Manuel.

Um agradecimento especial a Edileusa Cristina Gerhardt por ter me dado a oportunidade de admirá-la não só por sua capacidade profissional, muito obrigado por sua presença, por cada dúvida sanada e cada conselho amigo, vou levar o que me ensinou para a vida.

Ao Alex Tramontin Almeida por todas as vezes que me aguentou durante esses dois anos, vivendo no mesmo quarto, depois na mesma casa, entendo o quanto é difícil e por isso agradeço. Assim como a todos que moraram comigo, a Gabriela, a Milene e a Ana Maria. Tenho o maior carinho por pertencer à Sacizada.

Um obrigado mais que especial para Leandro Guimarães Ferreira, por ser a luz que vem no fim do túnel e por ter me dado esperança! Obrigado por suportar minhas tristezas, minhas ausências e por me dar apoio irrestrito. Seu amor foi fundamental e espero retribuí-lo agora que está ingressando na carreira acadêmica também.

A toda minha família, em especial minha mãe Luciane Santos, obrigado por dar todo o suporte financeiro, intelectual, emocional para encarar mais essa fase da minha vida. Obrigado por ter sido exemplo de garra, dedicação, perseverança e esperança de que tudo iria dar certo. Gostaria de dizer que nada disso poderia estar acontecendo se você, com 18 anos, não tivesse fugido de casa para prestar vestibular e nos dar uma vida melhor! Sou muito agradecido por tudo que me deu e espero estar à altura de sua dedicação.

Obrigado aos meus irmãos Luis e Isadora, que sentiram com o meu distanciamento e com minha mudança, senti saudades de vocês e da bagunça da casa. Obrigado pelos finais de semana que pude ir para Ponta Grossa e vocês me receberam de braços abertos!

RESUMO

A enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo sintetase (NadE) catalisa a amidação do ácido nicotínico adenina dinucleotídeo (NaAD) para formar NAD⁺. Essa reação é o último passo da biossíntese de NAD, e portanto é uma enzima chave no metabolismo. Enzimas NadE tipicamente usam glutamina ou amônia como doadores de nitrogênio, em uma reação dependente de ATP. Dada a função de NadE para o metabolismo de procariotos, NadE vêm atraindo interesse como alvo para antibióticos. Em vários organismos, podem ser encontradas várias cópias de genes que codificam para NAD sintetases. A bactéria associativa de plantas *Herbaspirillum seropedicae* possui dois genes que codificam para duas enzimas NadE1 e NadE2. O gene *nadE1* é ligado por contexto genômico ao gene *glnB* que codifica para a proteína transdutora de sinal GlnB. Anteriormente a NadE1 foi caracterizada cineticamente, e ela mostrou ter preferência por glutamina. Este trabalho mostra a confirmação da preferência de glutamina por NadE1 por ensaio de LC/MS, assim como a caracterização da proteína NadE2 de *H. seropedicae*. Após a clonagem, expressão e purificação da proteína NadE2, a análise de cromatografia de gel filtração sugere que NadE2 é uma enzima homo-dimérica. A caracterização cinética de NadE2 indica que seu domínio glutaminase é funcional, porém há preferência por glutamina em relação a amônia é sutil. Essa é a primeira investigação cinética de uma enzima glutamina-dependente dimérica.

Palavras chave: NAD⁺, glutaminase, enzima.

ABSTRACT

Nicotinamide adenine dinucleotide synthetase enzyme (NadE) catalyzes the amidation of nicotinic acid adenine dinucleotide (NaAD) to form NAD⁺. This reaction is the last step of NAD biosynthesis, therefore is a key enzyme of metabolism. NadE enzymes typically use glutamine or ammonium as nitrogen donors in an ATP-dependent reaction. Given the NadE function to prokaryote metabolism, it has attracted interest as a potential target for novel antibiotics. In several organisms, it is possible to find several copies of genes that codify to NAD synthetases. The plant associative bacterium *Herbaspirillum seropedicae* has two genes that encode for two different NAD synthetases, NadE1 and NadE2. The *nadE1* gene is genetically linked to *glnB*, encoding the signal transduction protein GlnB. Previously, NadE1 was characterized kinetically, and it shows preference for glutamine. In this work, the preference for glutamine is confirmed by LC/MS assay, as well as the characterization of *H. seropedicae* NadE2. After cloning, expression and purification of NadE2, gel filtration chromatography analysis suggests that NadE2 is a homodimer. Kinetic characterization of NadE2 indicates a functional glutaminase domain, although the preference for glutamine vs ammonium as nitrogen donor was only modest. This is the first biochemical characterization of a dimeric glutamine-dependent NAD synthetase.

Keywords: NAD⁺, glutaminase, enzyme.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)	17
2.2	A NITROGENASE	17
2.3	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	18
2.4	PROTEÍNAS P _{II}	19
2.5	A ENZIMA NAD SINTETASE	22
2.6	VIAS DE BIOSÍNTESE DE NAD ⁺	28
2.7	NAD sintetase e seu contexto genômico	30
3	JUSTIFICATIVA	35
4	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVOS GERAIS	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5	MATERIAS E MÉTODOS	37
5.1	BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	37
5.2	MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	38
5.3	MANIPULAÇÕES DO DNA	39
5.3.1	Amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	39
5.3.2	Eletroforese em gel de agarose	39
5.3.3	Isolamento e purificação de DNA	40
5.3.4	Clivagem do DNA com enzimas de restrição	41
5.3.5	Reação de ligação	41
5.3.6	Reação de sequenciamento	41
5.3.7	Preparo de células termocompetentes	42
5.3.8	Transformação das células termocompetentes	42
5.4	MÉTODOS GERAIS PARA PROTEÍNA	43
5.4.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (SDS-PAGE)	43
5.4.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição não desnaturante	44
5.4.3	Superexpressão de proteínas	44
5.4.4	Lise das células	45
5.4.5	Purificação de proteínas	45
5.4.6	Uridilação <i>in vitro</i> de proteínas P _{II}	47

5.5	ANÁLISE CINÉTICA DE NADE2-HISTAG	47
5.6	ANÁLISE DE COMPETIÇÃO DE SUBSTRATO POR LC/MS	47
5.7	ENSAIO DE INTERAÇÃO FÍSICA ENTRE NadE1 E NadE2 E PROTEÍNAS P _{II} POR ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO	49
6	RESULTADOS	51
6.1	CLONAGEM DO GENE <i>nadE2</i> EM VETOR pET28a	51
6.2	PURIFICAÇÃO DE NadE2-HISTAG DE <i>H. seropedicae</i>	53
6.3	PURIFICAÇÃO DE NadE2-MUTANTE DE <i>H. seropedicae</i>	54
6.4	PURIFICAÇÃO DE NadE1-HISTAG DE <i>H. seropedicae</i>	55
6.5	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO	56
6.6	ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	59
6.6.1	Curva padrão de NADH	59
6.6.2	Atividade enzimática da enzima NadE2 de <i>H. seropedicae</i>	60
6.6.3	Cinética de NadE2	60
6.6.4	Competição entre os substratos amônia e glutamina por LC/MS	64
6.7	PURIFICAÇÃO DE P _{II} HISTAG	65
6.8	ENSAIO DE INTERAÇÃO FÍSICA ENTRE NAD SINTETASE E P _{II}	66
6.9	ANÁLISES DE SEQUÊNCIA	68
7	DISCUSSÃO	73
8	CONCLUSÃO	76
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA DA REAÇÃO EM DOIS PASSOS CATALISADA PELA ENZIMA NAD SINTETASE.	23
FIGURA 2: ESTRUTURA DE NAD SINTETASE AMÔNIA DEPENDENTE DE <i>Deinococcus radiodurans</i>	24
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE NAD SINTETASE DE <i>M. tuberculosis</i>	26
FIGURA 4: ESQUEMA GERAL DA BIOSÍNTESE DE NAD ⁺ EM PROCARIOTOS.	29
FIGURA 5: CONTEXTO GENÔMICO DE NadE EM PROTEOBACTERIAS.	31
FIGURA 6: VISÃO GERAL DAS EVIDÊNCIAS DE INTERAÇÃO ENTRE NADE1 E OUTRAS PROTEÍNAS DE <i>H. seropedicae</i>	32
FIGURA 7: MAPA METABÓLICO DO METABOLISMO DA NICOTINAMIDA PARA O ORGANISMO <i>H. seropedicae</i>	34
FIGURA 8: ALINHAMENTO BLASTX DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NADE2 DEPOSITADA NO GENBANK E A NadE2 MUTANTE COM O CLONE MUTANTE.	52
Figura 9: ANÁLISE DOS PLASMÍDEOS RESULTANTES DA LIGAÇÃO ENTRE O PET28A E O INSERTO NADE2 POR RESTRIÇÃO NdeI/BAMHI.	53
FIGURA 10: PERFIL DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA NADE2 DE <i>H. seropedicae</i>	54
FIGURA 11: PERFIL DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA NADE2-MUTANTE DE <i>H. seropedicae</i>	55
FIGURA 12: PERFIL DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA NadE1-Histag DE <i>H. seropedicae</i>	56
Figura 13: ESTIMATIVA DAS MASSAS DE NadE1 E NadE2 DE <i>H. seropedicae</i> POR GEL FILTRAÇÃO.	58
FIGURA 14: PERFIL DE ELUIÇÃO DE NADE2 EM ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE MASSA.	58
FIGURA 15: CURVA PADRÃO DE NADH.	59
FIGURA 16: VELOCIDADE INICIAL E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO PARA A DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS.	61

FIGURA 17: COMPETIÇÃO ENTRE AMÔNIO E GLUTAMINA COMO SUBSTRATO NA REAÇÃO DE NadE1.	65
FIGURA 18: PERFIL DE ELUIÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE <i>H. seropedicae</i>	66
FIGURA 19: ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO DE NadE1-HISTAG E GlnB NA CONDIÇÃO DE ADP E ATP.	67
FIGURA 20: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE NAD SINTETASE.....	68
FIGURA 21: ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE NAD SINTETASE DE DIFERENTES ORGANISMOS.	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ESTIRPES DE BACTÉRIAS HOSPEDEIRAS E OS PLASMÍCEOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	37
TABELA 2: COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	38
TABELA 3: CONCENTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS USADOS	39
TABELA 4: COMPOSIÇÃO DO GEL DE SEPARAÇÃO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DESNATURANTE DE PROTEÍNAS.....	43
TABELA 5: COMPOSIÇÃO DO GEL DE EMPILHAMENTO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS	44
TABELA 7: COMPARAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS NAD SINTETASES DE H. SEROPEDICAE E OUTROS ORGANISMOS	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH – Álcool desidrogenase
ADP – 5' difosfato de adenosina
AMP – 5' monofosfato de adenosina
ATP – 5'trifosfato de adenosina
D.O.₆₀₀ – Densidade óptica de 600 nanômetros
DNA – Ácido desoxirribonucleotídeo
DTT - Ditionitrito
EDTA – ácido etilenodiaminotetra acético
FBN – fixação biológica de nitrogênio
GS – glutamina sintetase
2-OG – 2-oxoglutarato
IPTG – isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa - Quilodalton
Km - Canamicina
K_M – Constante de Michaelis-Menten
L – Litro
LA – Luria-Bertani Agar
LB – Luria-Bertani
MW – massa molecular
NaAD – ácido nicotínico adenina dinucleotídeo
NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NaMN – ácido nicotínico mononucleotídeo
NMN – nicotinamida mononucleotídeo
PA – persulfato de amônio
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR – reação em cadeia da polimerase

PPI – pirofosfato inorgânico

Rpm – rotações por minuto

SDS – dodecilsulfato de sódio

Sm - estreptomicina

TEMED – N,n-tetrametiletenodiamina

Tris – Tris(hidroximetil)-aminometano

UTP – uridina trifosfato

V – volt

1 INTRODUÇÃO

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+ e sua forma reduzida NADH) é um cofator importante em reações redox, além de ser consumido como substrato por enzimas como a DNA ligase e as ADP-ribosil transferases (SORCI; RUGGIERI; RAFFAELLI, 2014). Além disso, para manter a homeostase, NAD^+ precisa ser constantemente repostado, e isso pode ocorrer por uma via *de novo* ou por uma via de reciclagem (SORCI et al., 2009). O último passo na via *de novo* e, em alguns organismos, na via de reciclagem é a amidação de ácido nicotínico adenina dinucleotídeo (NaAD) para formar NAD^+ . Essa reação é catalisada pela enzima NAD sintetase ou NadE. Dado o papel central que NadE desempenha e como ela é amplamente distribuída entre os organismos, essa enzima é um possível alvo para antibióticos (BI; WANG; XIE, 2011). Foi demonstrado que a inibição de NadE em *Mycobacterium tuberculosis* possui efeito bactericida (RODIONOVA et al., 2014).

Diferentes classes de NAD sintetase foram encontradas na natureza. NAD sintetase amônia dependente $\text{NadE}^{\text{NH}_3}$ (E.C. 6.3.1.5) está presente em procariotos e usam amônio como substrato, essas enzimas são homodiméricas e foram extensivamente caracterizadas (DE INGENIIS et al., 2012; JAUCH et al., 2005b; RIZZI et al., 1996). A outra classe é a NAD sintetase glutamina dependente NadE^{Gln} (E.C. 6.3.5.1); estão presentes em eucariotos e procariotos e usam L-glutamina como substrato preferencial (DE INGENIIS et al., 2012). A NadE^{Gln} de *M. tuberculosis* é uma enzima octamérica, e em sua extremidade N-terminal possui um domínio glutaminase que hidrolisa L-glutamina a L-glutamato e NH_3 (LARONDE-LEBLANC; RESTO; GERRATANA, 2009). A amônia liberada é canalizada para o domínio sintetase na extremidade C-terminal, que catalisa a amidação ATP dependente de NaAD para formar NAD^+ (CHUENCHOR et al., 2012).

Dois genes que codificam para NAD sintetase glutamina dependente NadE^{Gln} foram encontrados no genoma da bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, chamados de *nadE1* e *nadE2* (PEDROSA et al., 2011). O gene *nadE1* é ligado por contexto genômico ao gene *glnB*, que codifica para a proteína de transdução de sinal GlnB. A proteína GlnB pertence à família de transdutores de sinal P_{II} (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013). A ligação por contexto genômico *nadE-glnB* é conservada em Proteobactéria, e já foi sugerido que GlnB poderia estar envolvida na regulação de NadE (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013).

Neste trabalho é descrita a purificação e a caracterização cinética de *H. seropedicae* NadE2. A enzima NadE2 pode usar tanto glutamina quanto amônia como doador amino *in vitro*. A determinação do K_M para esses substratos mostra que há uma sutil preferência de glutamina em relação ao amônia, como ocorre em NadE1 (LASKOSKI et al., 2016). Análise de cromatografia de gel filtração indica que NadE2 é a primeira enzima glutamina dependente homodimérica caracterizada cineticamente.

Além disso, um ensaio de competição de substrato por LC/MS foi realizado e confirma que NadE1 prefere o substrato glutamina em relação a amônia. Devido ao contexto genômico de *nadE-glnB*, experimentos de co-precipitação e de atividade enzimática foram realizados para investigar a interação de P_{II} com NadE e, embora os exaustivos esforços, não foi possível determinar as condições de interação entre estas proteínas. Mais estudos são necessários para determinar se e como as NAD sintetases glutamina-dependentes são reguladas em resposta aos níveis de nitrogênio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)

O nitrogênio é um dos elemento mais importantes para existência da vida, necessário para o metabolismo de aminoácidos, nucleotídeos e outras moléculas biologicamente importantes (REITZER, 2003). Na agricultura, o nitrogênio é um elemento limitante para a produtividade (HIREL et al., 2011). Com a intensificação do agronegócio e o consumo de alimentos, tornou-se necessário o estudo de outras alternativas de fertilização do solo além do nitrogênio industrial, que possui desvantagens como alto custo e a poluição de recursos hídricos (HIREL et al., 2011).

O mecanismo em que o nitrogênio pode ser convertido de N_2 a NH_3 por organismos é chamado de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). A FBN está presente em grupos filogenéticos de Bacteria como firmibacteria, actinomycetes, cyanobacteria e em todas as subdivisões de proteobactéria, assim como, em Archaea (DIXON; KAHN, 2004). Organismos fixadores de nitrogênio, ou diazotrofos, apresentam de forma conservada um conjunto de genes essenciais para a fixação de nitrogênio, que codificam principalmente para as subunidades do complexo da nitrogenase, a enzima responsável pela FBN (HILL, 1988).

Além disso, outros genes do sistema de regulação do metabolismo de nitrogênio (sistema Ntr) estão envolvidos na síntese e controle da atividade da nitrogenase (CHUBATSU et al., 2011). A nitrogenase é, portanto, peça chave no ciclo do nitrogênio, tornando as bactérias diazotróficas da rizosfera tópico de estudos na relação planta-bactéria (MONTEIRO et al., 2012).

2.2 A NITROGENASE

O complexo da nitrogenase é composto por duas metaloproteínas, a dinitrogenase ou proteína ferro-molibdênio (MoFe) e a dinitrogenase redutase ou proteína ferro (Fe) (LEIGH; DODSWORTH, 2007). A dinitrogenase é uma

proteína tetramérica ($\alpha_2\beta_2$) codificada pelos genes *nifD* e *nifK*, enquanto a dinitrogenase redutase é uma proteína dimérica (γ_2) codificada pelo gene *nifH*. Ambas são altamente sensíveis ao oxigênio devido aos seus grupamentos metálicos (CHUBATSU et al., 2011). Essa sensibilidade da nitrogenase ao oxigênio e a alta demanda energética para o processo de FBN em diazotrofos tornam importante a regulação por um sistema de resposta ao estado redox e ao status nutricional da célula, ou seja, a fixação de nitrogênio ocorre somente quando os níveis de oxigênio e nitrogênio são baixos. Outras fontes, como o amônio livre, acabam por inibir e/ou reprimir as vias de fixação (HUERGO et al., 2006). Em *H. seropedicae* a nitrogenase é regulada por um complexo sistema responsável pela regulação do metabolismo do nitrogênio, o sistema Ntr, composto pelas enzima removedora de uridilil (GlnD, gene *glnD*), a permease de amônio AmtB (gene *amtB*), glutamina sintetase (GS, gene *glnA*), enzima removedora de adenilil (GlnE, gene *glnE*), e o sistema de dois componentes NtrB-NtrC (genes *ntrB* e *ntrC*, respectivamente), além de proteínas transdutoras de sinal da família PII, GlnB e GlnK (genes *glnB* e *glnK*, respectivamente) (BONATTO, 2007; HUERGO et al., 2010; RONCATO-MACCARI et al., 2003).

2.3 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria gram-negativa pertencente a classe das β -proteobactérias, capaz de fixar nitrogênio atmosférico (BALDANI et al., 1986; JAMES et al., 1997; OLIVARES et al., 1996) e produzir fitohormônios que induzem o crescimento de plantas (BASTIÁN et al., 1998; MEZA; DE-BASHAN; BASHAN, 2015). Pode ser encontrada em associação com uma grande variedade de plantas de importância econômica como arroz, cana-de-açúcar, trigo, sorgo e milho (ARAÚJO et al., 2013; OLIVARES et al., 1996).

H. seropedicae se associa de forma endofítica com a planta, entrando por fissuras provocadas pela emergência de raízes laterais (JAMES et al., 2002; RONCATO-MACCARI et al., 2003). Devido a essa forma de colonização, *H. seropedicae* reduz a competição interespecífica em relação a rizosfera e aumenta a troca de exsudados entre a planta e a bactéria (MONTEIRO et al.,

2012). Estudos mostram que o efeito da inoculação de *H. seropedicae* em cultivares de gramíneas é aumentar o número de raízes laterais em trigo, arroz e milho (AMARAL et al., 2014; JAMES et al., 2002; NEIVERTH et al., 2014).

Além disso, dados de inoculação em campo sugerem que *H. seropedicae* pode aumentar significativamente a produtividade em culturas de arroz e milho (ARAÚJO et al., 2013, 2014; CANELLAS et al., 2013).

2.4 PROTEÍNAS P_{II}

Proteínas P_{II} são proteínas relativamente pequenas, homotriméricas e conservadas entre as bactérias. Regulam atividades de enzimas metabólicas e permeases através do controle da atividade de componentes da transdução de sinal e enzimas chave do metabolismo (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013). Os membros da família P_{II} estão presentes em bactéria, Archaea e eucariotos fototróficos, onde possuem um papel central no controle dos processos assimilatórios e assim, exibem uma enorme plasticidade de funções. A maioria das Proteobactérias, incluindo *E. coli* e *H. seropedicae*, possui duas proteínas parálogas de P_{II}: chamadas de GlnB e GlnK (FORCHHAMMER, 2008).

A estrutura geral de GlnB é um trímero com uma cavidade central e a maioria das interações entre as subunidades ocorrem em resíduos conservados. A junção dos monômeros forma três fendas laterais na interface de cada monômero, que apresentam um importante papel funcional. A estrutura monomérica apresenta duplo motivo $\beta\alpha\beta$ e três voltas chamadas volta B, volta C e volta T (RADCHENKO; MERRICK, 2011). As voltas de P_{II} possuem estrutura consideravelmente flexível e constituem a superfície de interação para modificação covalente, ligação de efetores e interação com alvos proteicos.

Em *H. seropedicae* o gene *amtB* é co-transcrito com o gene *glnK*, que codifica para uma proteína estruturalmente similar a GlnK de *E. coli* (NOINDORF et al., 2011) e a montante de *glnK* se encontra o gene *nlnA* que codifica para uma proteína associada a membrana com domínio Gcw-chp, encontrado em um grupo de proteínas bacterianas cuja função ainda não é conhecida (HUERGO et al., 2010). O gene *glnB* é monocistrônico e expresso

constitutivamente. As duas proteínas P_{II} de *H. seropedicae* GlnB e GlnK compartilham 78% de similaridade (NOINDORF et al., 2006) porém mutantes *glnB* e *glnK* de *H. seropedicae* mostraram que GlnK é a principal responsável pela regulação pós-traducional amônio-dependente da enzima nitrogenase e pelo controle da atividade de NifA (NOINDORF et al., 2011).

As proteínas da família P_{II} sensoriam o estado de energia e nitrogênio em dois níveis. O primeiro nível é quase universal e envolve a percepção do estado energético através da ligação de moléculas efetoras como o 2-oxoglutarato (2-OG) e ATP/ADP nas fendas laterais. Quando os níveis de 2-oxoglutarato na célula são altos, P_{II} está ligada a MgATP e 2-oxoglutarato (TRUAN et al., 2010). Assim que os níveis de 2-oxoglutarato diminuem, a afinidade por ATP é menor e a afinidade por ADP aumenta, P_{II} então muda para a forma com ADP (RADCHENKO; MERRICK, 2011). Mais recentemente mostrou-se que P_{II} possui atividade de ATPase regulada por 2-oxoglutarato e que a hidrólise de ATP a ADP é responsável por mudanças conformacionais em *E. coli*, *Azospirillum brasilense* e em *Arabidopsis thaliana*, e pode estar presente em vários outros organismos (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2013). Esse modelo ainda é alvo de discussão, pois em *Synechococcus elongatus*, experimentos realizados com transferência de energia por ressonância Förster (FRET) mostraram que usando somente a razão ATP/ADP e níveis de ADP é possível direcionar a interação de P_{II} com alvos que se ligam especificamente a P_{II} no estado ATP ou ADP (FORCHHAMMER; LÜDDECKE, 2016). Além disso, P_{II} de plantas podem ligar diretamente glutamina por uma extensão N-terminal (chamada de volta-Q), promovendo a interação de P_{II} com NAGK (N-acetyl-L-glutamato kinase) (CHELLAMUTHU et al., 2014). O segundo nível é menos conservado e envolve a modificação pós-traducional de P_{II}. Em Proteobactéria e Actinobactéria a volta-T de P_{II} contém sítios para modificação pós-traducional por GlnD, a qual realiza a uridililação reversível de P_{II} de forma glutamina dependente. Os níveis de glutamina são sensorizados pela enzima GlnD que uridilila P_{II} quando a célula possui pouca fonte de nitrogênio (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013). Enquanto que em Cyanobactéria a modificação pós-traducional na volta-T é por fosforilação, e em algumas podem ser adenililadas (FORCHHAMMER, 2008).

Quando sob condições limitantes de nitrogênio, a enzima GlnD uridilila as proteínas P_{II}, GlnB e GlnK permitindo que NtrB fosforile NtrC (NINFA; JIANG, 2005). NtrC fosforilada pode induzir NifA que é um ativador transcricional de genes relacionados à assimilação de nitrogênio. Por outro lado, quando há disponibilidade de amônio no meio, ele penetra na célula e é logo incorporado ao glutamato pela GS, aumentando a concentração de glutamina dentro da célula (JAVELLE et al., 2004). A glutamina inibe a uridililação de P_{II} por GlnD (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013). GlnB e GlnK interagem com NtrB e estimulam a desfosforilação de NtrC e consequente inibição dos promotores dependentes de NtrC (PIOSZAK; JIANG; NINFA, 2000). Esse mecanismo de uridililação e desuridililação é conservado em *H. seropedicae* (BONATTO, 2007).

P_{II} pode interagir direta ou indiretamente com vários outros alvos enzimáticos formando uma complexa cadeia regulatória. Acredita-se que a interação mais primitiva de P_{II} seja a interação física entre P_{II} e a proteína de membrana AmtB (JAVELLE; MERRICK, 2005). AmtB é uma proteína trimérica, integral de membrana, que forma um túnel em que ocorre o transporte de amônio quando este é limitante no ambiente extracelular. Quando P_{II} não está uridililada, ou seja, o nível intracelular de 2-OG é baixo, P_{II} pode formar um complexo com o AmtB na membrana, com envolvimento das voltas-T, bloqueando o canal de amônio (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013).

De forma conservada, o gene *amtB* é co-transcrito com P_{II} (SANT'ANNA et al., 2009). Estudos iniciais sugeriram que AmtB pudesse ser um alvo de P_{II}, visto que, com algumas exceções, o gene *amtB* é encontrado no mesmo operon que o gene *glnK* (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001). Ligação por contexto genômico conservada pode indicar funções relacionadas e ser usada na procura de novos alvos para P_{II}, como no exemplo de GlnK e AmtB. Outro caso é a ligação frequente e conservada entre os genes de *glnB* e *nadE* em Proteobacteria (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001; SANT'ANNA et al., 2009).

2.5 A ENZIMA NAD SINTETASE

A enzima NAD sintetase (NadE - EC 6.3.1.5) é responsável pelo último passo da biossíntese de NAD^+ , em que o grupamento amida é transferido da glutamina para o ácido nicotínico adenina dinucleotídeo (NaAD). NAD^+ é um cofator essencial em múltiplas reações entre elas: respiração celular, o balanço redox e a biossíntese de moléculas estruturais. A depleção de NAD^+ é deletéria para o metabolismo celular, devido ao seu papel de substrato em várias vias metabólicas, além de regular de forma ubíqua várias enzimas importantes através da relação de NAD^+/NADH . Assim, o estudo de NadE pode contribuir com estudos de enzimas que consomem NAD, relacionando a homeostase de NAD^+ e sua síntese com outros processos metabólicos. Por exemplo, a resposta ao estresse em bactéria e o metabolismo do DNA/RNA possuem algumas enzimas consumidoras de NAD como a DNA ligase, mono(ADP-ribosil) transferase e RNA 2'-phosphotransferase (SORCI; RUGGIERI; RAFFAELLI, 2014).

O estudo de NAD sintetases pode trazer avanços biotecnológicos tais como o trabalho de otimização da produção de energia elétrica através da energia química em bactérias, conseguida por meio da superexpressão de NadE (YONG et al., 2014). Nesse trabalho foi explorado o potencial das células de combustível microbiano (Microbial fuel cells) que são promissoras no aproveitamento de bioenergia de vários resíduos orgânicos. Porém a quantidade de energia produzida por essas células é pequena, o que torna sua aplicação ainda não realizável. YONG e colaboradores (2014) superexpressaram a NadE de *Pseudomonas aeruginosa* com o objetivo de aumentar os cofatores $\text{NAD}^{(+)/\text{H}}$, a estirpe modificada pode produzir três vezes mais energia que a selvagem. Outras modificações podem aumentar ainda mais a eficiência das células de combustível microbiano e possibilitar o uso dessa tecnologia.

O gene *nadE* de procariotos codifica para a proteína NAD sintetase, essa proteína possui um domínio sintetase pertencente à família das ATP pirofosfatases (TESMET et al., 1996). As enzimas ATP pirofosfatases catalisam a transformação ATP-dependente do seu substrato liberando pirofosfato (PPi). No caso das NAD sintetases o substrato é o NaAD e o produto é o NAD^+ . No

primeiro passo da síntese de NAD^+ , o grupo piridina carboxilato do NaAD é ativado por adenilação proveniente da hidrólise da molécula de ATP a AMP e PPi . No segundo passo ocorre a amidação do intermediário NaAD adenilado via reposicionamento nucleofílico da porção adenilato por amônio, produzindo o NAD^+ (DE INGENIIS et al., 2012) (FIGURA 1).

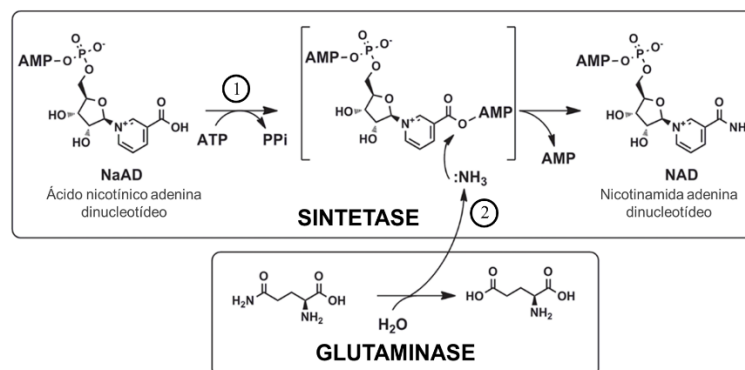


FIGURA 1: ESQUEMA DA REAÇÃO EM DOIS PASSOS CATALISADA PELA ENZIMA NAD SINTETASE.

No domínio sintetase ocorre a hidrólise do ATP liberando AMP e PPi , o grupo piridina carboxilato do NaAD é adenilado. 2. Ocorre a amidação do intermediário NaAD adenilado via reposicionamento nucleofílico da porção adenilato por amônio, essa amônio pode ser livre ou vinda da desamidação de glutamina a glutamato no domínio glutaminase. O produto NAD^+ pode agora seguir para outras vias na forma de cofator ou regulador.

Fonte: Adaptado de De Ingeniis et al., 2012.

Em procariotos as NAD sintetases podem ser divididas em dois grupos de acordo com os domínios presentes (RESTO; YAFFE; GERRATANA, 2009): enzimas com único domínio amônia dependente e enzimas com dois domínios, um sintetase e outro glutaminase. As enzimas com um domínio são chamadas de amônia-dependentes, como as NadE presentes em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (DE INGENIIS et al., 2012), *Bacillus anthracis* (MCDONALD et al., 2007), *Helicobacter pylori* (KANG et al., 2003), *E. coli* (JAUCH et al., 2005a) e *Bacillus subtilis* (SYMERSKY et al., 2002). A atividade catalisada por esse grupo de proteínas é somente de sintetase, incorporando amônio livre para a reação. Está bem estabelecido que as NAD sintetases amônia-dependentes de bactérias são homodiméricas (JAUCH et al., 2005) e são bastante conservadas em procariotos (PARK; YEO; LEE, 2014). Possuem mais da metade dos resíduos pertencentes a conformação α -hélice e as β -folha são frequentemente separadas por uma região α -hélice, além de voltas C-terminais. As β -folhas se dispõem paralelamente, formando o motivo Rossman

(frequentemente associado a enzimas que utilizam nucleotídeos como os cofatores FAD, NAD⁺ e NADP). Duas regiões α -hélices mediam contatos entre as subunidades do dímero. A interface do dímero é predominantemente apolar (JAUCH et al., 2005b) (FIGURA 2).

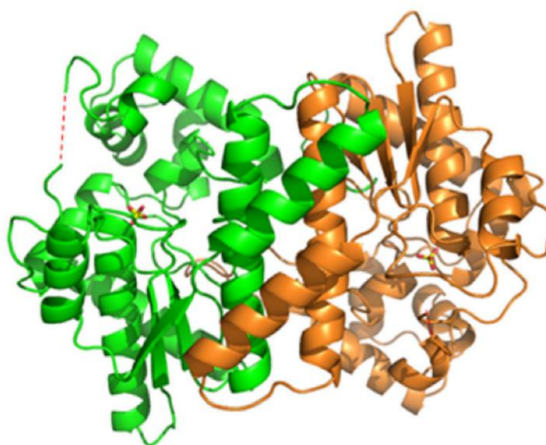


FIGURA 2: ESTRUTURA DE NAD SINTETASE AMÔNIA DEPENDENTE DE *Deinococcus radiodurans*.

Estrutura geral da proteína NAD sintetase homodimérica de *D. radiodurans*. Cada uma das subunidades está colorida em verde ou laranja.

Fonte: Retirado de Park, Yeo e Lee, 2014.

As NAD sintetases com dois domínios contém o primeiro domínio localizado na porção C-terminal do peptídeo e catalisa a hidrólise do ATP (PACE; BRENNER, 2001). Enquanto que no segundo domínio, localizado na porção N-terminal, ocorre a desamidação de glutamina, mostrando função de glutamina amidotransferase (DE INGENIIS et al., 2012; LARONDE-LEBLANC; RESTO; GERRATANA, 2009).

As NAD sintetases glutamina-dependentes possuem o domínio glutaminase pertencente a superfamília das nitrilases (PACE; BRENNER, 2001). Exemplos de NAD sintetase glutamina-dependentes encontram-se nos organismos *Mycobacterium tuberculosis* (BELLINZONI et al., 2005), *H. seropedicae* (LASKOSKI et al., 2016), *Thermus thermophilus* (DE INGENIIS et al., 2012), *Thermotoga maritima* (RESTO; YAFFE; GERRATANA, 2009). Evolutivamente, NAD sintetase com dois domínios, sendo um domínio glutaminase, parece ter surgido em um ancestral comum entre Eubacteria e Eukaryota, passando por transferência horizontal recentemente para Archaea (DE INGENIIS et al., 2012).

Um aspecto interessante do mecanismo das enzimas NAD sintetases glutamina-dependentes é a formação *in situ* de amônia através da desamidação de glutamina a glutamato por um domínio glutaminase (LARONDE-LEBLANC; RESTO; GERRATANA, 2009). No caso especial de *T. thermophilus* a função de glutaminase está por conta de uma subunidade específica que é codificada em um polipeptídeo independente que pode ser co-purificado com a subunidade sintetase (DE INGENIIS et al., 2012). A molécula de amônia é canalizada diretamente do domínio glutaminase para o sítio onde ocorrerá a amidação no domínio sintetase (CHUENCHOR et al., 2012).

A capacidade das NAD sintetases glutamina-dependentes de utilizar glutamina e também amônia como substrato *in vitro* gera grande discussão se a presença dos dois domínios permite a enzima utilizar tanto glutamina quanto amônia *in vivo*. Sabe-se que o substrato amônio pode ser assimilado por procariotos através da atividade de glutamato desidrogenase (GDH) ou do sistema GS/GO-GAT (glutamina sintetase/glutamato sintase, ou glutamina 2-OG amidotransferase). Em enterobactérias, essas duas vias podem ser ativadas de acordo com a disponibilidade de amônio, GDH em crescimento com alto amônio e GS em crescimento com baixo amônio (VAN HEESWIJK; WESTERHOFF; BOOGERD, 2013). Como a atividade da NAD sintetase é essencial para o metabolismo, há evidências que sugerem (mas não provam) que as NAD sintetases competem pelo amônio com outra enzima relevante no metabolismo geral, a GS (DE INGENIIS et al., 2012).

No trabalho de Broach, Neumann e Kustu (1979) foi utilizada uma estirpe mutante de *Salmonella enterica* Typhimurium, que possuía crescimento diminuído em condições de baixo nitrogênio mesmo com as enzimas GS, glutamato sintase e glutamato desidrogenase em níveis normais. Mais tarde, De Ingeniis e colaboradores (2012) caracterizaram a mutação e revelaram que a NAD sintetase de *S. enterica* Typhimurium possuía uma mutação que diminuía a atividade em 80 vezes e não havia diminuição na transcrição. Os autores sugeriram que a menor atividade de NAD sintetase mutante (com um K_M aparente de 6,7 mM para amônio) não poderia competir com a GS (com K_M aparente de 0,25 mM para amônio); diferentemente da enzima nativa que possui um K_M aparente da NAD de 0,09 mM para o amônio.

As NAD sintetases não se diferenciam somente na utilização ou não de glutamina como substrato. Por conta da adição de um domínio glutaminase na sua sequência, NadE glutamina-dependentes possuem estrutura diferenciada. A única NAD sintetase glutamina-dependente de procarioto com sua estrutura 3D determinada juntamente com dados cinéticos é do microrganismo *M. tuberculosis* (CHUENCHOR et al., 2012; LARONDE-LEBLANC; RESTO; GERRATANA, 2009). Esta enzima possui uma estrutura semelhante as NAD sintetases glutamina-dependentes de eucariotos. A NAD sintetase de *M. tuberculosis* apresenta uma organização homo-octamérica formada por dois tetrâmeros dispostos paralelamente, os domínios glutaminase ficam voltados para o lado interno da estrutura e os sintetase, para a borda externa. No centro da estrutura há dois anéis formados pelo empilhamento de oito domínios glutaminase e os domínios sintetase adjacentes se unem e estão dispostos nas extremidades como a estrutura de um quadrado (FIGURA 3A e 3B). Os domínios sintetase unidos são muito semelhantes às NAD sintetases amônia-dependentes com exceção de duas hélices adicionais, $\alpha 18$ e $\alpha 20$, que possuem papel na oligomerização, formando contatos por toda estrutura.

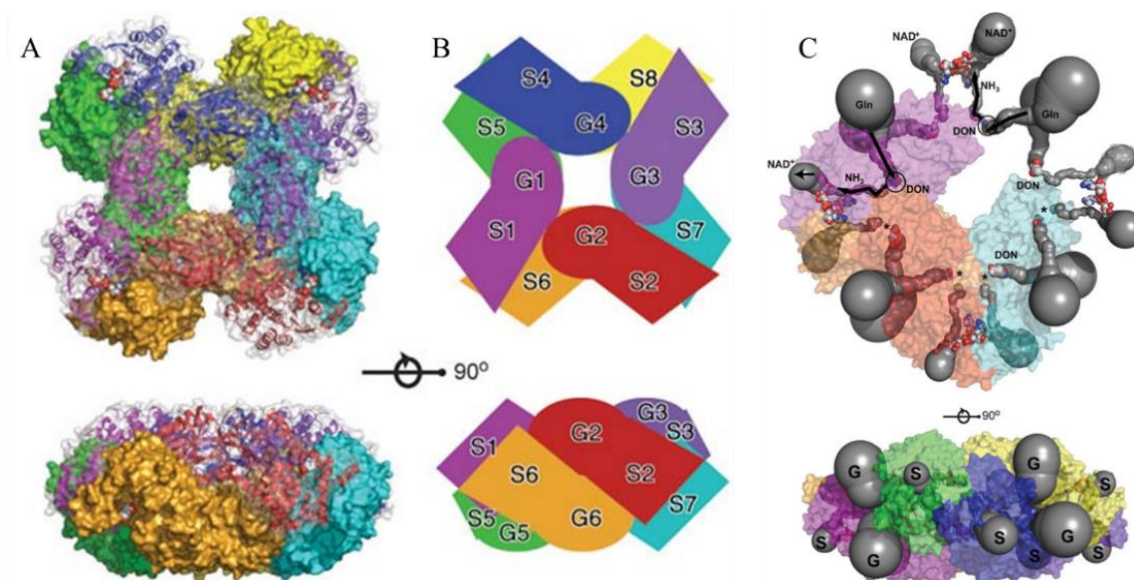


FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE NAD SINTETASE DE *M. tuberculosis*.

A. Estrutura quaternária de NAD sintetase. Dois anéis formados pelos domínios glutaminase são mostrados na figura, o anel de cima é representado em fita enquanto o anel a baixo é representado por superfície. B. Representação esquemática de NAD sintetase, domínios glutaminase (G1 a G8) estão alinhados na cavidade central, enquanto que os domínios sintetase (S1 a S8) formam dímeros na borda externa da estrutura. Em A e B uma rotação 90° sobre o eixo x é mostrada abaixo. C. Representação da estrutura de NadE com todos os oito túneis inter-subunidade. O tetrâmero é mostrado em superfície transparente ao fundo. Os túneis foram identificados pelo programa CAVER e não são contínuos em todas as

subunidades (indicado por *). As flechas negras indicam a direção que a glutamina chega ao domínio glutaminase e a amônia deixa o sítio e se dirige para o domínio sintetase, onde o NAD⁺ é formado. Uma rotação dessa estrutura a 90° é mostrada abaixo. Os túneis têm forma de U, e é interessante notar que não ligam o domínio glutamina G1 ao sintetase do mesmo peptídeo (ao S1), o túnel percorre um caminho mais próximo (aproximadamente 20 Å) até o domínio glutaminase da subunidade mais abaixo, por exemplo, o caminho da amônia liberada em G5 vai até o S1, ou G6 até o S2. Todo o percurso possui aproximadamente 73 Å, sendo 40 Å da Cys do domínio glutaminase até o grupamento carboxil do NaAD⁺.

DON: 6-diazo-5-oxo-L-norleucina. Um análogo de Glutamina usado para estudo da estrutura do sítio ativo da NAD sintetase.

Fonte: LaRonde-LeBlanc, Resto e Gerratana, 2009.

O domínio glutaminase de NadE de *M. tuberculosis* possui elementos da superfamília das nitrilases (PACE; BRENNER, 2001) com uma folha- β cercada de α -hélices. Na estrutura da NadE de *M. tuberculosis*, é possível visualizar um túnel que permite a glutamina acessar o domínio glutaminase, o que sugere uma limitação no acesso deste sítio (FIGURA 3C).

Além do túnel de glutamina há outro túnel interno que possui diâmetro de 2 Å e um terço dele está presente no domínio glutaminase, os outros dois terços se estendem no domínio sintetase adjacente, formando o túnel de amônia. O túnel tem uma pequena alça nos resíduos 127-131 em forma de U, chamada de alça YRE que está presente também em eucariotos. O programa CAVER usado não identificou túnel ligando o domínio sintetase ao domínio glutaminase no mesmo peptídeo, pela estrutura desse trabalho. Estes dados foram corroborados por ensaios de mutação sítio dirigida (CHUENCHOR et al., 2012). A estrutura do túnel que se origina no domínio sintetase (por exemplo S1) se estende até o domínio glutaminase de outra subunidade da proteína (por exemplo G5) (FIGURA 3C). Essa configuração é diferenciada em relação a estrutura de outras nitrilases que possuem o domínio sintetase no mesmo peptídeo, como as asparagina sintetases (LARONDE-LEBLANC; RESTO; GERRATANA, 2009).

Perto do sítio ativo do domínio glutaminase o túnel de amônia inter-subunidade possui uma constrição formada pelo aminoácido Phe130 e outros dois aminoácidos hidrofóbicos. Essa região do túnel tem um diâmetro de 0,8 Å. Entre o túnel de glutamina e o de amônia (interface S1-G5) os aminoácidos Glu129, Lys644 e Asp656 (conservados entre procariotos) interagem mediando a transição entre um segmento do túnel e o outro. O aminoácido Arg128 está localizado na interface no túnel de glutamina e os aminoácidos Glu129 e

Tyr131 no túnel de amônia. Mutações nessas regiões e na alça YRE mostram que esses aminoácidos são importantes para a eficiência na utilização de glutamina e comprometem a transferência de amônia entre os sítios (há desperdício de glutamina no domínio glutaminase devido a não sincronização desse sítio com o sítio sintetase, conseqüentemente ocorre perda de amônia gerado pela hidrólise da glutamina para a solução). No final do túnel de amônia, no sítio ativo da sintetase, um resíduo conservado de Asp497, perto de NaAD⁺, é importante para a formação de um intermediário aminado antes da amidação de NaAD⁺ (CHUENCHOR et al., 2012).

O domínio sintetase, presente em todas as NAD sintetases, pertence à família das ATP pirofosfatases. Nesse domínio a moléculas de amônia vindas do sítio ativo da glutaminase passam por resíduos que formam ligações de hidrogênio em Asn641, que está localizado em uma alça com outros dois aminoácidos que contribuem para a segunda constrição no túnel. Sabe-se que essa constrição é dinâmica e ocorre na presença de amônia no túnel (CHUENCHOR et al., 2012).

2.6 VIAS DE BIOSÍNTESE DE NAD⁺

As vias de produção do NAD⁺ podem convergir para um ramo único, composto por dois passos, dentre os quais, NadE catalisa o último passo, convertendo NaAD em NAD⁺ através de um processo de amidação ATP dependente (FIGURA 4). Em alguns organismos, esse último passo pode apresentar uma rota alternativa de reciclagem, catalisada pela nicotinamida mononucleotídeo adenililtransferase (NadR) (RODIONOVA et al., 2014; STANCEK; SCHNELL; RYDÉN-AULIN, 2005). Essa característica das vias de biossíntese de NAD⁺ tornam a NadE uma enzima chave do metabolismo (SORCI et al., 2013). A via de produção de NAD⁺ é promissora na busca de novos alvos para antibióticos (RODIONOVA et al., 2014). Foi demonstrado que inibidores de NAD sintetases podem ser deletérios tanto para formas replicadoras quanto não replicadoras (de resistência) de bactérias patogênicas (RAO et al., 2008).

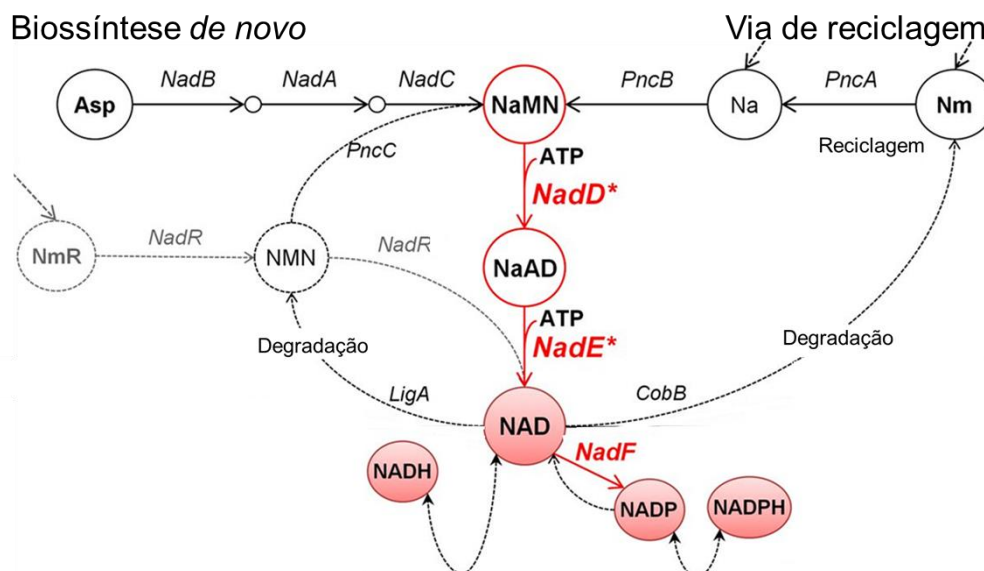


FIGURA 4: ESQUEMA GERAL DA BIOSÍNTESE DE NAD⁺ EM PROCARIOTOS.

Os principais metabólitos foram abreviados como: Asp, aspartato; Na, ácido nicotínico; Nm, nicotinamida; NmR, ribosídeo de nicotinamida; NaMN, ácido nicotínico mononucleotídeo; NMN, nicotinamida mononucleotídeo; NaAD, ácido nicotínico adenina dinucleotídeo. Enzimas: NadB, L-aspartato oxigenase; NadA, quinolato sintase; NadC, ácido quinolítico fosforibosiltransferase; NadD, ácido nicotínico mononucleotídeo adenililtransferase; PncA, nicotinamida deaminase; PncB, ácido nicotínico fosforibosiltransferase; LigA, DNA ligase; NadR, dupla função N-ribosilnicotinamida cinase e NMN adenililtransferase.

Fonte: Rodionova et al. (2014)

A inibição de NAD sintetase pode levar a várias consequências para o metabolismo, pois o estudo desses mutantes é comprometido caso a inibição seja extrema e passa a ser letal. Para investigar os efeitos de inibição de NadE em *M. tuberculosis*, Rodionova e colaboradores (2014) utilizaram um sistema de degradação de NadE modificado para incluir um sítio de clivagem pela protease HIV-2. A protease somente é induzida quando há adição de anidrotetraciclina. A inibição de NadE afetou a atividade de via de biossíntese de aminoácidos, ácidos graxos e o ciclo do ácido cítrico (RODIONOVA et al., 2014). Na biossíntese dos aminoácidos, fenilalanina e tirosina foram as mais afetadas, já que estas vias requerem a presença de NAD⁺ que é empregado como cofator enzimático. Na biossíntese de ácidos graxos, a depleção do cofator NAD⁺ causou a diminuição em 30% da atividade da biossíntese de C16:0 e 70% na síntese de C24:0. O efeito é maior para os ácidos graxos de cadeia mais longa, devido a dependência de NAD⁺ para a reação. O efeito mais significativo foi no ciclo do ácido cítrico, com a diminuição nos substratos fumarato e malato enquanto que não houve efeito para os substratos α -

cetoglutarato e succinato, demonstrando o efeito da depleção de NAD^+ em enzimas da via como a α -cetoglutarato desidrogenase (RODIONOVA et al., 2014).

Com efeitos contrários, a superexpressão de NadE pode causar um óbvio aumento de NAD^+ e dos níveis de NAD^+/NADH . Os experimentos realizados em *E. coli* com superexpressão da NAD sintetase amônia-dependente relatam aumento na taxa de crescimento, de consumo de glucose e na produção de succinato (LIANG et al., 2013; WANG et al., 2013). Nestes trabalhos, os autores mostram que a superexpressão das enzimas NadD (ácido nicotínico mononucleotídeo adenililtransferase) e NadE pode ser metabolicamente equilibrada pelo aumento no consumo de NAD^+ por enzimas como a NAD cinase e a NAD pirofosfatase. Essa resposta celular a maiores níveis de NAD^+ pode ser entendida como uma forma de prevenir os danos pelo excesso de NAD^+ , como por exemplo a inibição da DNA ligase que é conhecida por ter atividade de converter NAD^+ a NMN (nicotinamida mononucleotídeo) (SORCI; RUGGIERI; RAFFAELLI, 2014; WANG et al., 2013).

2.7 NAD sintetase e seu contexto genômico

Em Proteobacteria o gene *glnB* é co-transcrito ao gene *glnA* que codifica a enzima GS ou ao gene *nadE* que codifica a enzima NAD sintetase dependente de glutamina (FIGURA 5). Em Archaea, PII estão associadas aos genes *amtB*. Interessantemente na espécie de Archaea Crenarchaeota como *Pyrobaculum islandicum* e *Thermoproteus neutrophilus* os genes para PII estão flanqueados por *nadE* e *amtB*. Como Crenarchaeota e Proteobacteria são grupos distantes, é descartada a transferência genética horizontal, dados mostram que a associação genética de PII-*nadE* pode ser um produto de uma evolução convergente entre Proteobacteria e Archaea (SANT'ANNA et al., 2009).

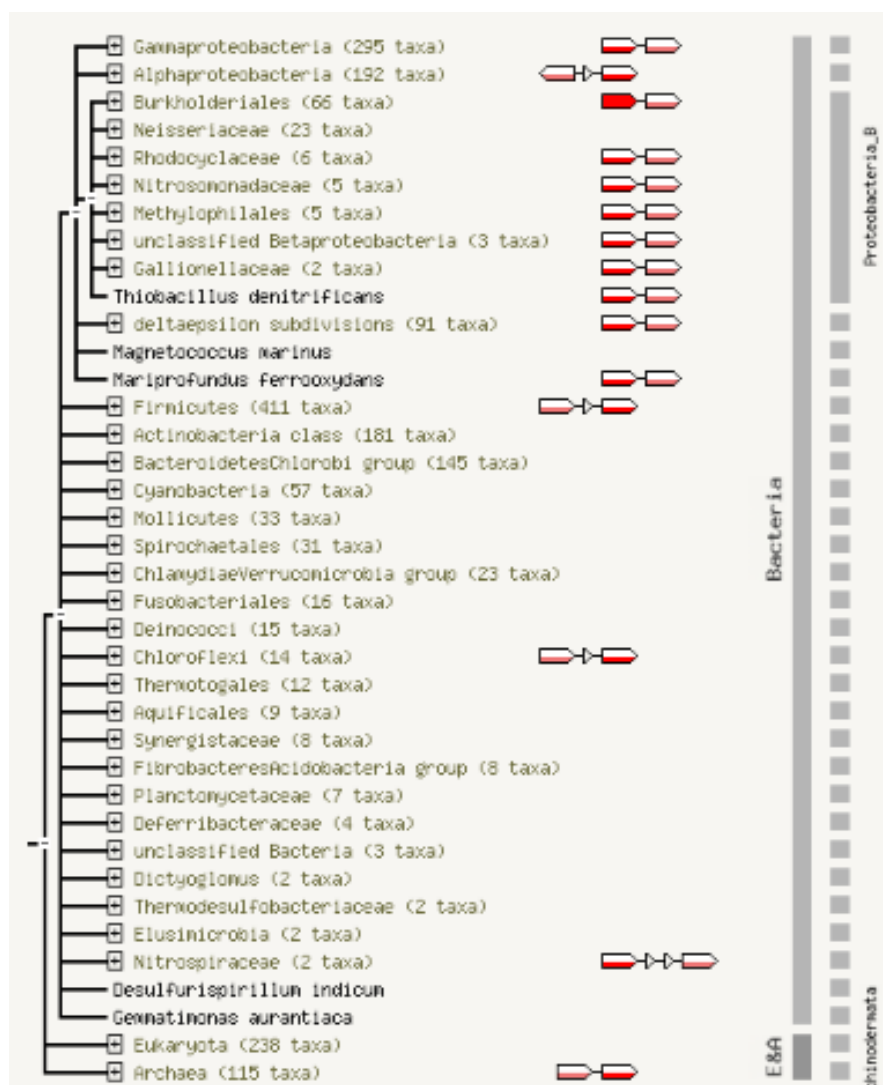


FIGURA 5: CONTEXTO GENÔMICO DE *NadE* EM PROTEOBACTERIAS.

Contexto genômico de várias *nadE* entre as proteobactérias obtido pelo programa STRING 2016 mostrando a ligação por contexto genômico conservada de *nadE* (flecha vermelha) e *glnB* (flecha rosa).

Nos grupos em que *Pil-nadE* se encontram no mesmo contexto genômico, NAD sintetase é glutamina-dependente (SANT'ANNA et al., 2009), portanto a atividade dessas enzimas pode ser regulada pela interação com *Pil* em resposta a disponibilidade de glutamina intracelular (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013).

No genoma de *H. seropedicae*, o gene que codifica para *GlnB* encontra-se a 176 pares de base do gene que codifica para a proteína *NadE1* (PEDROSA et al., 2011). Em uma busca de conservação filogenética utilizando o programa STRING, *H. seropedicae* apresenta uma pontuação de 0,8 para a interação entre *GlnB* e *NadE1* em uma faixa de pontuação com máximo de 1,0.

Para essa pontuação contribuíram os relatos na literatura da conservação do contexto genômico de *nadE1* (FIGURA 6).

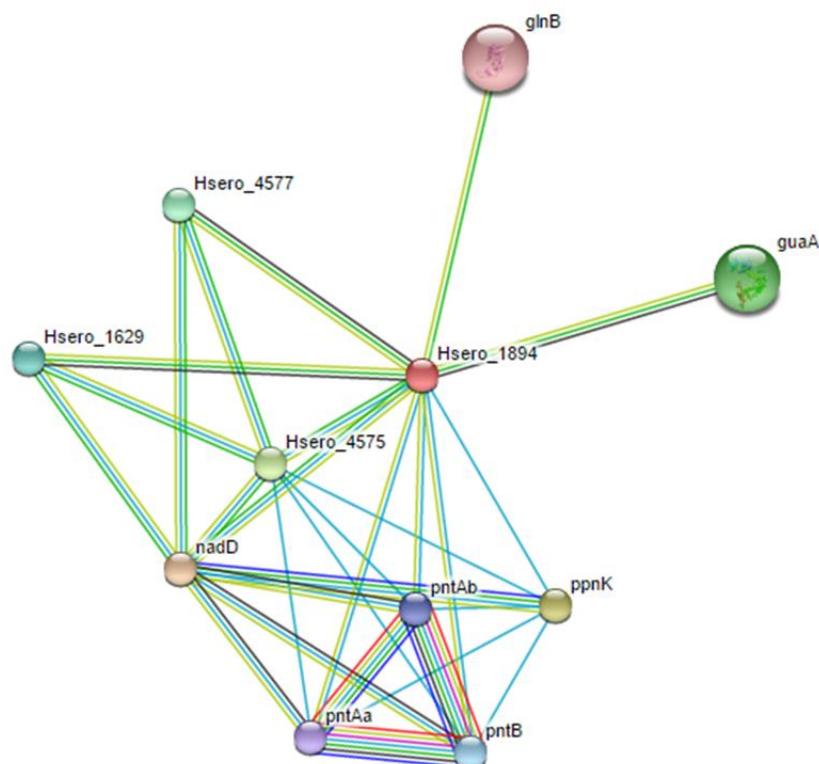
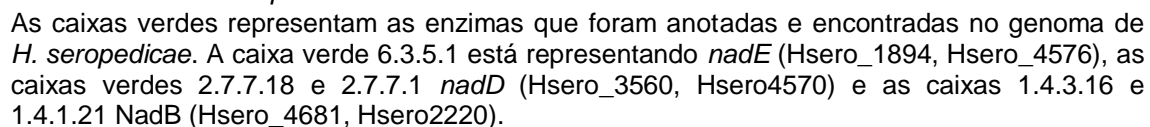


FIGURA 6: VISÃO GERAL DAS EVIDÊNCIAS DE INTERAÇÃO ENTRE NADE1 E OUTRAS PROTEÍNAS DE *H. seropedicae*.

Busca no programa STRING com o gene *nadE1* representando em um gráfico de linhas a possível interação de NadE com outras proteínas do genoma de *H. seropedicae*. O resultado para a proteína anotada como *nadE* glutamina dependente, chamada nesse trabalho de NadE1. A proteína Hsero_1894 (NadE1) está no centro das evidências de interação, as linhas coloridas representam diferentes evidências de interação: a linha verde entre NadE1 e GlnB representa a evidência de interação através do contexto genômico; e a linha verde claro representa as sugestões de interação na literatura. Outras linhas, entre NadE1 e outras proteínas também estão mostradas, representam possível co-expressão, linhas negras; e banco de dados de interação está representado em azul claro.

Além disso, evidências experimentais no trabalho de (GERHARDT, 2015) reforçam a hipótese de que as enzimas NadE glutamina-dependente são alvos potenciais das proteínas PII. No trabalho está apresentado um ensaio de identificação de interação proteína-proteína em larga escala feita com a P_{II} de *A. brasilense* GlnZ como isca em afinidade com proteínas do extrato proteico de *A. brasilense*. Nesse ensaio foi observado que dentre as três NAD sintetases codificadas pelo genoma de *A. brasilense*, duas foram capazes de interagir com a proteína GlnZ e, curiosamente são anotadas como glutamina-dependentes. Uma terceira forma de NadE, anotada como amônia dependente, não apareceu como positivo neste ensaio de interação.

Uma busca no banco de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) (FIGURA 7) sobre o metabolismo de biossíntese de NAD⁺, revelou que *H. seropedicae* é capaz de codificar enzimas para as vias de produção de NAD⁺ que utilizam aspartato como precursor. Curiosamente *H. seropedicae* apresenta dois genes *nadD* (Hsero_3560, Hsero4570) e *nadB* (Hsero_4681, Hsero2220). O gene *nadB* codifica para a proteína L-aspartato oxigenase (NadB) e *nadD* para a proteína ácido nicotínico mononucleotídeo adenililtransferase. Em *H. seropedicae* há duas cópias para NAD sintetases: *nadE1* e *nadE2*. Ambos são homólogos de sintetases dependentes de glutamina com a presença de um domínio funcional envolvido na hidrólise de glutamina (ou domínio glutaminase) (LASKOSKI et al., 2016). No entanto, não se sabe se as duas cópias são ativas fisiologicamente em *H. seropedicae*, e não é conhecida a relevância funcional da presença de cópias adicionais de genes para esta enzima. Uma busca no banco de dados revelou que vários organismos possuem mais de uma cópia de NAD sintetase, como por exemplo *A. brasilense* que possui três. Não existem estudos que exploraram a importância de cópias adicionais de NAD sintetase em nenhum outro organismo, assim como não há estudos investigando a NAD sintetase como um alvo de PII.



3 JUSTIFICATIVA

Herbaspirillum seropedicae apresenta dois genes que codificam para NAD sintetase (*nadE1* e *nadE2*). Em trabalho anterior a enzima NadE1 foi clonada e caracterizada cineticamente. Porém a enzima NadE2 não apresentou atividade *in vitro*. Posteriormente uma análise de sequência do clone utilizado mostrou que este possuía mutações que poderiam ter causado a ausência de atividade.

As NAD sintetases podem utilizar amônia ou glutamina como doador de nitrogênio. Estudos de caracterização de preferência de substrato podem corroborar análises cinéticas na busca de uma resposta para a utilização de glutamina versus a de amônia *in vivo*.

Além disso, como enzima central no metabolismo, há pouca informação sobre a regulação de NAD sintetase. Estudos que podem investigar a interação de NAD sintetase com enzimas reguladoras podem elucidar um importante ponto dentro do metabolismo geral. A ligação por contexto genômico genética entre o gene de *glnB*, que codifica para a proteína transdutora de sinal GlnB, foi mostrada como de grande conservação entre Proteobacteria. Evidências experimentais com o organismo *A. brasilense* mostram que NAD sintetase é um provável alvo de P_{II}.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos desse trabalho foram a caracterização cinética da proteína NadE2, a investigação da preferência de NadE1 pelo substrato glutamina e a caracterização da interação entre as proteínas NAD sintetases e P_{II}.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- Clonar o gene *nadE2* de *H.seropedicae* no vetor pET28a;
- Expressar e purificar a proteína NadE2-Histag;
- Purificar a proteína NadE1-Histag;
- Determinar a preferência de NadE1 por glutamina ou amônia;
- Determinar a atividade específica de NadE2
- Determinar o K_M aparente de NadE2-Histag para os substratos glutamina e amônio;
- Determinar se as proteínas P_{II} interagem com NadE1 e NadE2;

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na TABELA 1.

TABELA 1: ESTIRPES DE BACTÉRIAS HOSPEDEIRAS E OS PLASMÍCEOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

	Genótipo e/ou fenótipo	Referência ou fonte
Estirpes		
<i>H. seropedicae</i> SMR1	Estirpe selvagem (Sm ^R)	Souza <i>et al.</i> , 2000
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ- (Sm ^R)	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3)	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Plasmídeos		
pET28a	vetor de expressão, His-Tag/promotor T7 (Km ^R)	Novagen
pET29a	vetor de expressão, His-Tag/ promotor T7 (Km ^R)	Novagen
pETnadE1	pET28a contém o gene <i>nadE1</i> de <i>H. seropedicae</i> (2059 pb) fusionado a His-Tag, clonado como um fragmento <i>NdeI/BamHI</i> (Km ^R)	Laskoski <i>et al.</i> , 2016
pETnadE2	pET28a contém <i>nadE2</i> de <i>H. seropedicae</i> (1698 pb) (V189I; G376S; G381R; Q475R) fusionado a His-Tag, clonado como um fragmento <i>NdeI/BamHI</i> (Km ^R)	Laskoski, 2010
pETnadE2Hs	pET28a contém o gene <i>nadE2</i> de <i>H. seropedicae</i> (1698 pb) (selvagem) fusionado a His-tag, clonado como um fragmento <i>NdeI/BamHI</i> (Km ^R)	Este trabalho
pETnadE1N	pET29a contém o gene <i>nadE1</i> de <i>H. seropedicae</i> (2059 pb) (plasmídeo expressa proteína nativa), clonado como um fragmento <i>NdeI/BamHI</i> (Km ^R)	Este trabalho
pEMB101.8	pET28b+ contém o gene <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> (plasmídeo expressa proteína nativa), pT7 (Km ^R)	Benelli <i>et al.</i> , 2001
Sem nome	pET28a+ contém o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> com His-Tag, pT7 (Km ^R)	Oliveira M.A.S. comunicação

pEMB200	pET29a+ contém o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> (plasmídeo expressa proteína nativa), pT7 (Km ^R)	pessoal Bonatto et al., 2007
pglnBHs	pET28a contém o gene <i>glnB</i> de <i>H. seropedicae</i> com His-Tag (Km ^R)	Este trabalho

5.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A composição dos meios de cultura e as soluções para o meio NFbHPN-malato estão mostradas na TABELA 2. Todos os meios de cultivo bacterianos foram preparados e autoclavados por 20 minutos a 120°C para esterilização como descrito por SAMBROOK, FRITSH e MANIATIS (1989). Para obtenção dos meios na forma sólida foi adicionado 15 g/L de ágar antes da autoclavação. Para o meio NFbHPN-malato foram adicionadas no momento do uso 20 mM de NH₄Cl e Solução de fosfatos.

TABELA 2: COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS NESTE TRABALHO

Meio	Composição (por litro de meio)
Luria-Bertani (LB)	10 g triptona; 5 g extrato de levedura e 10 g NaCl.
NFbHPN-malato (Líquido)	0,2 g MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,1 g NaCl; 0,02 g CaCl ₂ ; 0,06 g ácido nitrilo-triacético; 0,02 g Fe-SO ₄ .7H ₂ O; 5 g Ácido málico; 1,0.10 ⁻⁴ g Biotina; Solução microelementos
Solução para meio NFbHPN-malato	Composição (por litro de meio)
Solução microelementos	2,0.10 ⁻³ Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O; 2,35.10 ⁻³ g MnSO ₄ H ₂ O; 2,8.10 ⁻³ g H ₃ BO ₃ ; 8,0.10 ⁻⁵ g CuSO ₄ .5H ₂ O
Solução de fosfatos	4 g KH ₂ PO ₄ ; 6 g K ₂ HPO ₄

H. seropedicae foi cultivado em meio NFbHPN-malato (KLASSEN et al., 1997) em estufa (meios sólidos) ou sob agitação a 120 rpm (meio líquido), ambos a 30°C. As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) sob agitação de 120 rpm ou em meio sólido Luria-Bertani Agar (LA) em estufa, a 37°C.

Os meios esterilizados foram suplementados com antibióticos em concentração apropriada para selecionar a estirpe bacteriana e/ou o plasmídeo

de interesse. Os antibióticos usados estão listados na TABELA 3. Os estoques de Canamicina e Estreptomicina foram esterilizados por filtração.

TABELA 3: CONCENTRAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS USADOS

ANTIBIÓTICO (SIGLA)	CONCENTRAÇÃO	
	Estoque (mg/mL)	Uso (µg/mL)
Canamicina (Km)	100	100
Estreptomicina (Sm)	80	80

5.3 MANIPULAÇÕES DO DNA

5.3.1 Amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O gene *nadE2* foi amplificado por PCR usando como molde o DNA genômico de uma cultura de *H. seropedicae* SMR1 previamente crescida por 16 horas, aquecida a 95°C por 5 minutos e centrifugada a 13000 rpm por 1 minuto, e a enzima de alta fidelidade *Pfu* (Fermentas). Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram: 5'*Nde*I_{Hs2}: 5' GGATGCCCATATGCTTCGCATCGCCATCG 3' e 3'*Bam*HI_{Hs2} 5' AACAGGGGATCCATGGCAATCGGGTCC 3'; a sequência sublinhada indica os sítios de restrição para as enzimas *Nde*I/*Bam*HI, respectivamente (LASKOSKI, 2010). Sob as condições: 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos, 72°C por 26 segundos e por fim extensão de 72°C por 3 minutos.

5.3.2 Eletroforese em gel de agarose

A agarose foi diluída em tampão TAE1x (preparado a partir do TAE 50x 2 mol/L Tris base; 20 mM de ácido acético glacial e 50 mM EDTA pH 8,0, pH 8,0) a concentração variou entre 1-2% (m/v) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As amostras foram misturadas com corante F. E. FSUDS 1x. As corridas eletroforéticas foram realizadas entre 60-80 V por 40-90 min e usando o mesmo tampão. Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e o excesso de corante foi retirado com água

destilada. O DNA foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta (312 nm) EC³ System - UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA USA) acoplado a um sistema de câmara.

5.3.3 Isolamento e purificação de DNA

O isolamento e purificação do DNA plasmidial foi feito seguindo o método de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Foram utilizados 2 mL de cultura de células incubadas por aproximadamente 16 horas. A cultura foi centrifugada durante 1 minuto a 13000 rpm (centrifuga minispin eppendorf), o meio sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 100 µL de tampão GET (50 mmol/L glucose, 10 mmol/L EDTA, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0).

A lise foi realizada adicionando-se 200 µL de Solução de lise (0,2 mol/L NaOH; 1% (m/v) SDS). A mistura foi submetida a inversão, o DNA cromossomal, proteínas e o SDS foram precipitados por adição de 150 µL de Solução KacF (3,0 mol/L acetato de potássio; 11,5% (v/v) ácido acético) seguida de incubação por 10 minutos em gelo. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm (centrifuga minispin eppendorf) e foi adicionado 10 µg/mL de RNase seguido de incubação por 30 minutos a 37°C. Após, foram adicionados 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a solução foi homogeneizada e centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm. A fase aquosa superior foi coletada e foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto para precipitação do DNA plasmidial e a mistura foi incubada por no mínimo 30 minutos.

Após a incubação a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 13000 rpm, o sobrenadante descartado e o pellet lavado com etanol 70 % (v/v). Após centrifugação por 7 minutos o etanol foi descartado com ponteira sem encostar no pellet e o etanol restante foi seco em bancada e em seguida ressuspensão em água MilliQ. Alternativamente DNA plasmidial foi purificado usando kit ilustra plasmid Prep Mini Spin (GE Healthcare, UK). O DNA obtido através de produto de PCR foi purificado utilizando QI quick PCR purification kit (Quiagem). Para subclonagem o fragmento foi purificado de gel de agarose com UltraClean® GelSpin® DNA Extraction Kit (Mobio laboratories, Quiagen).

5.3.4 Clivagem do DNA com enzimas de restrição

As reações de clivagem do DNA foram realizadas em volumes de reação de 10 µL ou 100 µL. As endonucleases utilizadas foram *NdeI/BamHI* (New England Biolabs/ Fermentas) em concentração de acordo com o fabricante. Foi adicionado Tampão React 3 (Invitrogen) 1x, e aproximadamente 100 ng de DNA purificado. As reações foram incubadas a 37°C pelo tempo necessário para a clivagem do DNA.

5.3.5 Reação de ligação

A mesma reação de restrição do item 5.3.4 foi realizada para a linearização dos vetores de expressão pET28a e pET29a usando 100 µL de volume total. Após linearizarem, os vetores foram submetidos a reação com SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) por 1 hora seguida de inativação por aquecimento a 60°C por 1 minuto. Os vetores de expressão e os respectivos insertos foram adicionados a uma razão molar 1:10. Na reação de ligação foram adicionados Tampão de ligação 1x (Invitrogen) e 1 U de enzima T4 DNA ligase e água MilliQ q.s.p. em um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 16°C por 16 horas antes de ser usada para transformação por choque térmico.

5.3.6 Reação de sequenciamento

Para o sequenciamento de DNA foi utilizado o método BigDye Terminator (Applied Biosystems) utilizando o protocolo indicado pelo fabricante. O sistema de reação com volume final de 10 µL continha 0,2 µg do DNA plasmidial purificado ou do produto de PCR purificado (item 5.3.3.), 10 pmol de iniciador para o promotor T7 ou T7 terminator (Novagen) ou um dos iniciadores para sequenciamento interno: nadE21: 5' – GTGGCCGAATACCACAAG -3'; nadE22: 5' - GCTGCTCTACGTCAACCAG -3'; nadE23: 5' - GATTCGGCCGTGACCATC -3' e nadE24: 5' - CCAACGGCTATGACGCC -3'. À reação também foi adicionado 1 µL de reagente de sequenciamento BigDye e 1x Tampão Save Money. A composição foi submetida em termociclador a 1

ciclo de 1 minuto a 96°C e 30 ciclos de 15 segundos a 96°C seguidos de 15 segundos a 55°C e 4 minutos a 60°C.

A reação de sequenciamento foi misturada com acetato de amônio 7,5 M e etanol 96% na seguinte proporção (40µl da reação de PCR, 26µl de acetato de amônio, 133µl de etanol), a mistura foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos, sendo centrifugada 13.000rpm por 20 minutos. O DNA precipitado foi lavado 2X com etanol 70%, seco a vácuo.

5.3.7 Preparo de células termocompetentes

Para o preparo de células termocompetentes, um pré-inóculo de 3 mL de *E. coli* foi incubado sob agitação por aproximadamente 16 horas com os antibióticos adequados. O inóculo foi feito a partir de 1 mL do pré-inóculo em 50 mL de meio LB e incubado até que a DO₆₀₀ atingir entre 0,4 e 0,6. A cultura incubada foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C (Hitachi) e o sobrenadante descartado. O pellet de células foi ressuspenso em 12 mL de solução 100mM MgCl₂ gelada estéril, mantendo as células resfriadas por todo procedimento. As células ressuspendidas foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspenso em 5 mL de solução 100mM CaCl₂ gelada estéril. Após, foram adicionados mais 25 mL de solução de CaCl₂. Essa suspensão foi mantida em gelo por pelo menos 20 minutos antes de ser centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos a 4 °C (Hitachi). O sobrenadante foi descartado e ressuspenso em 5 mL de solução 100 mM CaCl₂ em 15% (v/v) de glicerol gelado e estéril, a ressuspensão foi centrifugada e o procedimento anterior repetido. Por último a ressuspensão foi centrifugada novamente e ressuspendida em 1 mL de solução de CaCl₂ em 15% (v/v) de glicerol gelado e estéril. As células em solução foram divididas em alíquotas de 100 µL e estocadas a -80°C.

5.3.8 Transformação das células termocompetentes

Para a transformação foram adicionados 5 µL de DNA plasmidial ou proveniente de ligação (aproximadamente 100 ng) nas células termocompetentes e a mistura mantida em gelo por 30 minutos. A mistura foi submetida a choque térmico por 45 segundos a 42°C e então incubada por 2

minutos antes de serem ressuspensas em meio LB e incubadas por 37°C durante 40 minutos. Posteriormente, estas células foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos adequados.

5.4 MÉTODOS GERAIS PARA PROTEÍNA

5.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (SDS-PAGE)

As análises eletroforéticas de proteínas em gel de poliacrilamida em condição desnaturante foram feitas como descrito por LAEMMLI (1970) (30 g/L Tris-base; 140 g/L glicina; 10 g/L SDS) usando sistema de minigéis Höefer ou BioRad. As amostras, antes de serem analisadas por SDS-PAGE, foram misturadas com tampão de amostra (2% SDS (m/v); 10% glicerol (v/v); 0,01% azul de bromofenol (v/v); 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8) adicionando 5% de β -mercaptoetanol (v/v) na hora do uso e aquecidas a 95°C por 3 minutos. As eletroforeses foram realizadas a 150-200V em tampão Laemmli (1x) durante 40-50 minutos, o gel foi corado com solução de azul de Coomassie e em seguida descorado com solução descorante ou corado com coloração de prata através de método descrito em BLUM *et al.* (1987).

A porcentagem de acrilamida/bis-acrilamida no gel de separação dependeu da massa molecular das proteínas que estavam sendo analisadas. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (Höefer/Biorad). As soluções foram misturadas na ordem nas quantidades indicadas na TABELA 4. Para o gel de empilhamento foram utilizados os componentes nas quantidades indicadas na TABELA 5.

TABELA 4: COMPOSIÇÃO DO GEL DE SEPARAÇÃO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DESNATURANTE DE PROTEÍNAS

Componentes	Concentração final de acrilamida							
	7,5%		10%		12,5%		15%	
	1 gel	2 géis	1 gel	2 géis	1 gel	2 géis	1 gel	2 géis
H ₂ O	2,8 mL	5,6 mL	2,55 mL	5,1 mL	2,16 mL	4,32 mL	1,87 mL	3,74 mL
Solução 2	1,25 mL	2,5 mL	1,25 mL	2,5 mL	1,25 mL	2,5 mL	1,25 mL	2,5 mL
Acrilamida 40%	0,94 mL	1,88 mL	1,20 mL	2,4 mL	1,54 mL	3,08 mL	1,88 mL	3,76 mL
10% PA	50 μ L	100 μ L	50 μ L	100 μ L	50 μ L	100 μ L	50 μ L	100 μ L
TEMED	5 μ L	10 μ L	5 μ L	10 μ L	5 μ L	10 μ L	5 μ L	10 μ L

A sigla PA significa persulfato de amônio e TEMED N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina. Solução 2 é formada por 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 e 0,3% SDS (m/v).

TABELA 5: COMPOSIÇÃO DO GEL DE EMPILHAMENTO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS

Componentes	1 gel	2 géis
H ₂ O	1,595 mL	3,19 mL
Solução 3	0,625 mL	1,25 mL
Acrilamida 40%	0,280 mL	0,56 mL
10% PA	25 µL	50 µL
TEMED	2,5 µL	5 µL

Solução 3 é formada por 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 e 0,4% SDS (m/v).

5.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição não desnaturante

As eletroforeses de proteína em gel não desnaturante foram realizadas conforme descrito FORCHHAMER & TANDEAU de MARSAC (1994). E o sistema da Hoefer de minigéis foi usado. As amostras foram misturadas a Tampão de amostra e analisadas em gel de poliacrilamida Native-PAGE de acordo com a TABELA 6. As soluções foram adicionadas na ordem indicada. As corridas foram realizadas a 100 V por 4 horas em tampão de corrida gel nativo 1x (5 mM Tris-base e 38,4 mM glicina).

5.4.3 Superexpressão de proteínas

Aproximadamente 10 colônias de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo de interesse para a superexpressão foram pré-inoculadas em 20 mL de LB. Após 16 horas de incubação, 16 mL da cultura foram adicionados a 800 mL de LB com antibiótico, além disso, na superexpressão das proteínas PII de *H. seropedicae* foram adicionados 20 mM de NH₄Cl como uma forma de saturar o cultivo com fonte de nitrogênio e evitar a uridililação das PII por GlnD endógena. A cultura foi mantida sob agitação pelo tempo necessário para que a D₀₆₀₀ estivesse em torno de 0,5-0,7. Após esse tempo foram adicionados 0,5

mM de IPTG e a cultura foi incubada por mais 3 horas a 37°C (no caso das proteínas PII nativas e histag) ou por mais 16 horas a 16°C (no caso das NAD sintetases tanto nativas quanto histag). A cultura crescida e incubada após a superexpressão foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos (Hitachi). O sobrenadante foi descartado e as células foram coletadas e mantidas a -40°C até o momento da purificação. Um mililitro da cultura foi coletado separadamente para confirmação da superexpressão por análise em gel SDS-PAGE.

5.4.4 Lise das células

O sedimento celular, contendo proteínas P_{II}-His e as proteínas NadE1 e NadE2-His, foi ressuspendido em Tampão de sonicação 1 (20mM de Tampão Fosfato pH 7,4; 100 mM de NaCl ou 100 mM de KCl ou NaCl;10% glicerol (v/v); 1mM de PMSF; 1mg/mL de lisozima; 1mg/mL de DNase), e finalmente o sedimento contendo as proteínas P_{II} nativas em Tampão de sonicação 2 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 10% glicerol (v/v); 1mM de PMSF; 1mg/mL de lisozima; 1mg/mL de DNase) ou Tampão de sonicação 3 (Para a NadE1-nativa – 20 mM HEPES pH 7,4; 100 mM NaCl;10% glicerol (v/v); 1mM de PMSF; 1mg/mL de lisozima; 1mg/mL de DNase). Em seguida as células foram mantidas em gelo e rompidas por sonicação (10 vezes com pulsos de 15 segundos e intervalos de 30 segundos). Cem microlitros dessa fração foram reservados para análise em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e foram chamados de extrato bruto. O restante do lisado foi centrifugado a 30000 rpm por 20 minutos (Hitachi). O precipitado foi reservado para visualização em gel de acrilamida e chamado de extrato insolúvel. Do sobrenadante foram reservados 100 µL para o gel de proteínas e o restante seguiu para os diferentes métodos de purificação.

5.4.5 Purificação de proteínas

As proteínas NadE1-Histag e NadE2-Histag foram purificadas de acordo com Laskoski (2010), respectivamente as proteínas GlnB e GlnK nativas e Histag foram purificadas de acordo com (MOURE et al., 2012).

5.4.5.1 Purificação de proteínas NadE1, NadE2, NadE2-mutante GlnB e glnK fusionadas com cauda His

As proteínas NadE1-histag, NadE2-histag foram purificadas com a coluna Hitrap™ Chelating HP 1mL ou 5 mL (GE – healthcare) acoplada a um

sistema de bomba peristáltica. A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna (VC) de água MilliQ, em seguida carregada com solução NiCl_2 e lavada com 2 VC de água Milli-Q para retirar o excesso de NiCl_2 . A coluna foi equilibrada com 5 VC de Tampão de equilíbrio (20mM de Tris-HCl pH 8,0, 100mM de NaCl, 20mM de Imidazol, 10% de glicerol (v/v)) e carregada com a fração solúvel (item 5.4.4.). A coluna foi lavada com 5 VC de tampão de lavagem (20mM de Tris-HCl pH 8,0, 100mM de NaCl, 50mM de Imidazol, 10% de glicerol (v/v)). As proteínas-His foram eluídas com gradiente crescente de imidazol em frações de 1 mL. Para as proteínas GlnB e GlnK-His de *H. seropedicae* o mesmo procedimento foi empregado substituindo 100 mM de NaCl por 100 mM de KCl e o Tris-HCl pH 8,0 pelo pH 7,5. As frações foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE e as que apresentavam maior pureza foram reunidas.

5.4.5.2 Desalting

Para a retirada do imidazol ou sal das proteínas eluídas foi utilizada a coluna Hitrap desalting 5 mL (GE healthcare) acoplada a um sistema de bomba peristáltica. A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna (VC) de água Milli-Q e depois equilibrada com Tampão desalting (20mM de Tris-HCl pH 8,0, 100mM de NaCl/100 mM de KCl, 10% de glicerol (v/v)). Um mililitro e meio foi aplicado na coluna e frações de 1,5 mL foram coletadas. Aquelas frações com maior concentração de proteína foram reunidas, separadas em alíquotas de 100 μL e armazenadas a -40°C .

5.4.5.3 Purificação de proteínas nativas

As frações solúveis da superexpressão das proteínas PII de *H. seropedicae* foram submetidas a tratamento térmico 70°C por 15 minutos e centrifugado a 30000 rpm por 20 minutos (Hitachi). O sobrenadante foi carregado em uma coluna de Heparina equilibrada com tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH8,0; 50 mM NaCl; 10 mM MgCl_2 e 5% glicerol (v/v)). As proteínas foram eluídas com gradiente crescente de NaCl (0,05-1 M) e frações de 1 mL foram coletadas. As frações foram analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e aquelas que apresentavam maior pureza foram reunidas e dialisadas em Tampão de equilíbrio.

A fração solúvel da superexpressão da proteína NadE1 nativa foi utilizada para vários experimentos preliminares na tentativa de purificação. No

entanto não foi possível obter resultados satisfatórios em nenhuma das tentativas. Nos ensaios do item 5.7. foi utilizado a fração solúvel de NadE1 nativa.

5.4.6 Uridililação *in vitro* de proteínas P_{II}

As proteínas GlnB e GlnK nativas foram uridililadas em um sistema contendo a proteína GlnD de *H. seropedicae* (0,5 μ M) (cedida gentilmente pelo Prof. Doutor Marco A. S. de Oliveira), ATP (200 μ M), 2-OG (5 μ M), UTP (1 mM) e tampão de uridililação (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM KCl; 25 mM MgCl₂) (Bonatto *et al.* 2012). A reação foi mantida a 37°C por no mínimo 16 horas. O sucesso da reação de uridililação foi verificado através de eletroforese não desnaturante de proteínas (item 5.4.2.).

5.5 ANÁLISE CINÉTICA DE NADE2-HISTAG

A formação de NAD⁺ foi monitorada acoplando a produção do NAD⁺ pela enzima NAD sintetase com a redução a NADH pela enzima Álcool desidrogenase ADH de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma). Nos ensaios cinéticos foi utilizado 5 μ g de NadE2, 6 U de ADH de levedura (Sigma), 20 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 62 mM Tris-HCl pH 8,5, 1,6% etanol (v/v), 10 mM DTT, 10 mM de ATP, 1 mM NaAD, (variando entre 2,5-10000 μ M) glutamina e (variando entre 50-100000 μ M) amônio em uma reação de 300 μ L de volume final. A enzima foi incubada sem o substrato NaAD por 15 minutos e as reações foram realizadas a 30°C em Tecan Infinity 200 (Tecan) em placas de 96 poços. As reações foram iniciadas pipetando NaAD em intervalos de 10 segundos. A absorbância a 340 nm foi medida e somente a fase linear da reação foi usada para determinar o NADH produzido por comparação a uma curva padrão de NADH. As constantes de Michaelis-Menten (K_m) foram determinadas pelo programa Prism.

5.6 ANÁLISE DE COMPETIÇÃO DE SUBSTRATO POR LC/MS

Com o propósito de comparar a habilidade de NadE1 de usar glutamina ou amônia como doador de nitrogênio, experimentos foram realizados combinando

diferentes quantidades de ^{14}N glutamina e ^{15}N NH_4Cl 98% marcado (Sigma) em 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM ATP, 2 mM NaAD, 5 mM MgCl_2 e 1mM DTT. As reações foram iniciadas adicionando 50 nM de NadE1 e incubação a 30°C. Amostras com 40 μL foram coletadas após 5 minutos e misturadas a 10 μL de ácido acético glacial 10% (v/v) para parar a reação. As amostras foram centrifugadas a 20000 g por 5 minutos a 4°C e 10 μL do sobrenadante foi usado para análise em LC/MS (RODRIGUES et al., 2011).

Metabólitos foram separados usando UFLC Prominence (Shimadzu) em uma coluna C18 2,6 μm 50 x 2,1 mm (Phenomenex) mantida a 40°C. A fase móvel composta por 15 mM de ácido acético e 10 mM tributilamida (solvente A) ou metanol (solvente B). As amostras foram colocadas em vials e mantidas em amostragem automática a 4°C; 10 μL de cada amostra foi injetado a 0,2 mL min^{-1} em duplicatas. Os metabólitos foram eluídos usando um gradiente linear (0-100% de solvente B) por 30 minutos. A coluna foi equilibrada com solvente A por 10 minutos antes de cada corrida.

A detecção dos metabólitos foi realizada acoplando o LC com um MicroTOF-QII (Bruker Daltonics), equipado com uma fonte de ionização eletrospray. Íons negativos foram detectados dentre 50-1000 m/z cada segundo. A voltagem do capilar foi mantida a -3500 V, a pressão do nebulizador foi mantida a 2.0 bar e o gás secante 61 min^{-1} , 180°C. O tempo de retenção foi confirmado usando 50 μM de solução padrão e rastreando íon molecular no modo negativo ($m/z = 662,1 \pm 0,05$). A porcentagem de incorporação de ^{15}N -amônia em relação a incorporação de ^{14}N -glutamina foi medido pela fórmula $(\text{Int}_{m/z\ 663} \times 100) / \text{Int}_{m/z\ 662} - 22,7$. Pela fórmula é possível obter o aumento na porcentagem de incorporação no sinal m/z 663,1 devido a incorporação de ^{15}N -amônia diminuído de valor teórico 22,7% que é a contribuição isotópica no sinal de 662,1 m/z pelo $1\text{-}^{13}\text{C}\text{-}^{14}\text{N}$ NAD^+ . O valor obtido (que corresponde somente a $^{12}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}$ NAD^+), foi somado: 25% correspondente a distribuição natural isotópica teórica de todos os sinais de ^{15}N NAD^+ (22,7 % devido a $1\text{-}^{13}\text{C}$ + 2,3 % devido a $2\text{-}^{13}\text{C}$), e 2%, pela correção do ^{14}N na preparação de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ usada (98% de átomos marcados).

5.7 ENSAIO DE INTERAÇÃO FÍSICA ENTRE NadE1 E NadE2 E PROTEÍNAS P_{II} POR ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO

Os experimentos de interação física entre as NAD sintetases de *H. seropedicae* foram realizados através de co-precipitação usando beads magnéticos MagneHis Ni-Particles (Promega). As proteínas NadE1-Histag, NadE2-Histag, GlnB-Histag e GlnK-Histag foram imobilizadas em resina de Ni²⁺. Para cada uma dessas proteínas GlnB e GlnK (para as NAD sintetases His) e NadE1 (para as P_{II} His) nativas foram testadas em diferentes tampões para a possível interação física entre essas proteínas em condições *in vitro* segundo Huergo e colaboradores (2007), com adaptações. Os ensaios foram realizados em tampão de interação (50 mM Tris-HCl – pHs 6,8; 7,5; 8,0 ou 8,8; 100 mM NaCl; 20 mM imidazol pH 8,0; 10% glicerol (v/v); 5 mM MgCl₂) adicionando combinações das proteínas de *H. seropedicae* NadE1-Histag ou NadE2-Histag com as P_{II} uridililadas e não uridililadas nativas, assim como utilizando as P_{II}-Histag e a proteína NadE1-nativa. Os ensaios foram realizados utilizando aproximadamente 50 µg da proteína His e 20 µg da proteína nativa.

Para testar as diferentes condições em que as proteínas P_{II} podem interagir com seu alvo, ao tampão de interação foram adicionados 1 mM de ATP, 1 mM de ATP+ 1,5 mM de 2-OG ou 1 mM de ADP. Outros aditivos foram testados como 1 mM de glutamina, 1 mM de DTT e presença e ausência dos detergentes LDAO ou TWEEN 20 (ambos a 0,05% v/v).

Para cada reação foram utilizados 10 µL de beads magnéticos em tubos de 1,5 mL. Os beads foram lavados com 200 µL de tampão de interação, os tubos foram colocados em uma estante magnética para a separação dos beads do restante do líquido. A porção líquida foi retirada com pipeta e depois foram adicionados mais 500 µL de tampão de interação, além da proteína NadE1-Histag, NadE2-Histag, GlnB-Histag ou GlnK-Histag. A mistura foi incubada por 15 minutos, a parte líquida composta por tampão e interação e excesso de proteína His foi retirado com ajuda da estante magnética. Em seguida, 200 µL de tampão de interação foram adicionados, junto com a proteína GlnB, GlnK ou extrato de indução de NadE1 nativa e a mistura incubada por mais 15 minutos. Depois de três lavagens com 200 µL de tampão, os beads foram ressuspensos em tampão de amostra e aquecidos a 95°C por 3 minutos. A interação por co-

precipitação foi analisada por gel SDS-PAGE corado por coloração de prata. Os ensaios foram realizados em pelo menos duplicata.

6 RESULTADOS

6.1 CLONAGEM DO GENE *nadE2* EM VETOR pET28a

No trabalho de Laskoski (2010) foram caracterizadas as enzimas NadE1 e NadE2 do organismo *H. seropedicae*. A caracterização cinética de NadE1 revelou que esta proteína utiliza a glutamina preferencialmente em relação a amônia e que pelos dados de gel filtração é um provável octâmero. Já a NadE2 não mostrou atividade em ensaio *in vitro*, e o experimento de gel filtração sugeriu que NadE2 fosse um dímero. Porém, a sequência do gene *nadE2* clonado durante o trabalho não foi verificada. Posterior análise da sequência (realizada pelo Prof. Dr. Luciano F. Huergo) mostrou que esse clone possuía 5 mutações, delas, quatro haviam substituição de aminoácidos: V189I, G376S, G381R e Q475R (FIGURA 8). Essas mutações poderiam comprometer a atividade *in vitro* e, portanto, o gene *nadE2* de *H. seropedicae* deveria ser clonado sem mutações.

O gene *nadE2* foi novamente amplificado usando como molde o DNA genômico de *H. seropedicae* SMR1. O fragmento contendo aproximadamente 1700 pares de base foi submetido à restrição por *NdeI/BamHI* e a uma reação de ligação ao plasmídeo comercial pET28a (Novagen). A construção permite que sejam adicionados, na hora da tradução, seis resíduos do aminoácido histidina na extremidade N-terminal da proteína. Essa modificação nos permite uma rápida e eficiente purificação da proteína de interesse. Os clones obtidos através da ligação foram conferidos por restrição e um foi escolhido por soltar o inserto de 1700 pares de base quando restringido com as enzimas *NdeI/BamHI* (FIGURA 9). A sequência desse clone foi conferida por sequenciamento através de iniciadores internos, que cobriram todo o inserto e não apresentou mutações em relação à sequência submetida no GenBank (número de acesso CP002039). O novo clone foi chamado de pETnadE2Hs.

NadE2 mutada	1	MLRIAIAQCNPTIGDFEGNLALHLDGLQRAAQAGADLVVFPELSICGYYPGDLLEEARFL	180
NadE2 Genbank	1	MLRIAIAQCNPTIGDFEGNLALHLDGLQRAAQAGADLVVFPELSICGYYPGDLLEEARFL	60
NadE2 mutada	181	DRAEATLQDVIDATRRLPGLTAVIGAPRRNPGPGKPLFNALLAVREGRIVAEYHKQLLPV	360
NadE2 Genbank	61	DRAEATLQDVIDATRRLPGLTAVIGAPRRNPGPGKPLFNALLAVREGRIVAEYHKQLLPV	120
NadE2 mutada	361	YGVFDDGRHFEAGPETACVLPLKGMRVGFLICEDGWNDLRSYRVNPF EKLAQADAQLVV	540
NadE2 Genbank	121	YGVFDDGRHFEAGPETACVLPLKGMRVGFLICEDGWNDLRSYRVNPF EKLAQADAQLVV	180
NadE2 mutada	541	SINASPSD I GKRSQRHALFQAACLRRQMALLYVNQVGGQDQLVYDGGSFAMSP LQGLAFE	720
NadE2 Genbank	181	SINASPSD V GKRSQRHALFQAACLRRQMALLYVNQVGGQDQLVYDGGSFAMSP LQGLAFE	240
NadE2 mutada	721	AARLAEDFQVLA FEGGRFLRSDGVGAPQCIDQTMATPEFHRRQ ILLGLRDYARRCGFGKV	900
NadE2 Genbank	241	AARLAEDFQVLA FEGGRFLRSDGVGAPQCIDQTMATPEFHRRQ ILLGLRDYARRCGFGKV	300
NadE2 mutada	901	VVGSSGGIDS AVTIALAAEALGAQNVVAVTMP SVFSSAGSVSDSETLCQALGVTLFRHPI	1080
NadE2 Genbank	301	VVGSSGGIDS AVTIALAAEALGAQNVVAVTMP SVFSSAGSVSDSETLCQALGVTLFRHPI	360
NadE2 mutada	1081	ADLVREFEDGFATAF S APLR R LPLENLQARVRGAILMEYSNGYDALLLTGNKSEISVG Y	1260
NadE2 Genbank	361	ADLVREFEDGFATAF G APLR G LPLENLQARVRGAILMEYSNGYDALLLTGNKSEISVG Y	420
NadE2 mutada	1261	CTLYGDTNGGLGLIGDLYKTEVYALARHLNAQAGREIIPAAIIDKAPS AELAPD R RTDTS	1440
NadE2 Genbank	421	CTLYGDTNGGLGLIGDLYKTEVYALARHLNAQAGREIIPAAIIDKAPS AELAPD Q RTDTS	480
NadE2 mutada	1441	LPPYEVLD EILKWHIEGSRLPADEAQA AARTVEQLSGTDTGAALVERICRMVARNEYKRR	1620
NadE2 Genbank	481	LPPYEVLD EILKWHIEGSRLPADEAQA AARTVEQLSGTDTGAALVERICRMVARNEYKRR	540
NadE2 mutada	1621	QSPPVIRLRSRAFGSGRQIPIAVRY	1695
NadE2 Genbank	541	QSPPVIRLRSRAFGSGRQIPIAVRY	565

FIGURA 8: ALINHAMENTO BLASTX DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA NADE2 DEPOSITADA NO GENBANK E A NadE2 MUTANTE COM O CLONE MUTANTE.

O inserto do plasmídeo pETnadE2 (LASKOSKI, 2010) foi sequenciado com cobertura de pelo menos duas vezes. Os pontos destacados em amarelo mostram os aminoácidos que mudaram da sequência do GenBank em relação a sequência do clone NadE2 mutado. Quatro pontos são destacados: V189I, G376S, G381R e Q475R.

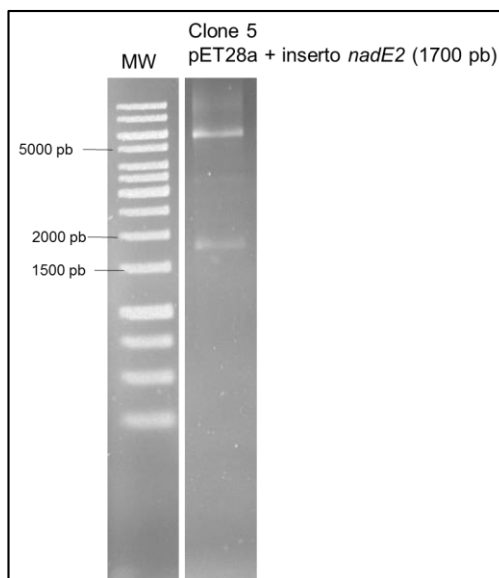


Figura 9: ANÁLISE DOS PLASMÍDEOS RESULTANTES DA LIGAÇÃO ENTRE O PET28A E O INSERTO NADE2 POR RESTRIÇÃO NdeI/BAMHI.

Gel de agarose ~1% corado com brometo de etídeo. A primeira linha está o marcador de massa molecular, três bandas estão com o tamanho indicado na figura em pares de base. Na linha seguinte a restrição do DNA plasmidial purificado de uma das colônias obtidas da ligação entre o plasmídeo pET28a (com aproximadamente 5300 pares de base) e o inserto *nadE2* (com aproximadamente 1700 pares de base). O clone 5 foi escolhido para a transformação em *E. coli* BL21 (DE3).

6.2 PURIFICAÇÃO DE NadE2-HISTAG DE *H. seropedicae*

O plasmídeo pETnadE2Hs foi inserido em *E. coli* BL21 (DE3) e as colônias transformadas foram crescidas em meio de cultivo para a superexpressão. A superexpressão desse clone resultou uma grande quantidade de proteína no tamanho esperado para a NadE2, aproximadamente 64KDa. O cultivo foi então lisado, e a enzima NadE2 foi separada do restante de proteínas por cromatografia de afinidade utilizando a resina Hi-trap *chelating* carregada com níquel. A NadE2 foi eluída em um pico homogêneo e com grande quantidade em aproximadamente 200 mM de imidazol (FIGURA 10). As frações C6 a C12 foram reunidas e o tampão com imidazol foi substituído por tampão sem imidazol através de cromatografia de exclusão de massa tipo *desalting*. A proteína pura ficou com uma concentração final de 3,8 µg/µL e o rendimento foi de aproximadamente 20 mg de proteína por litro de cultura.

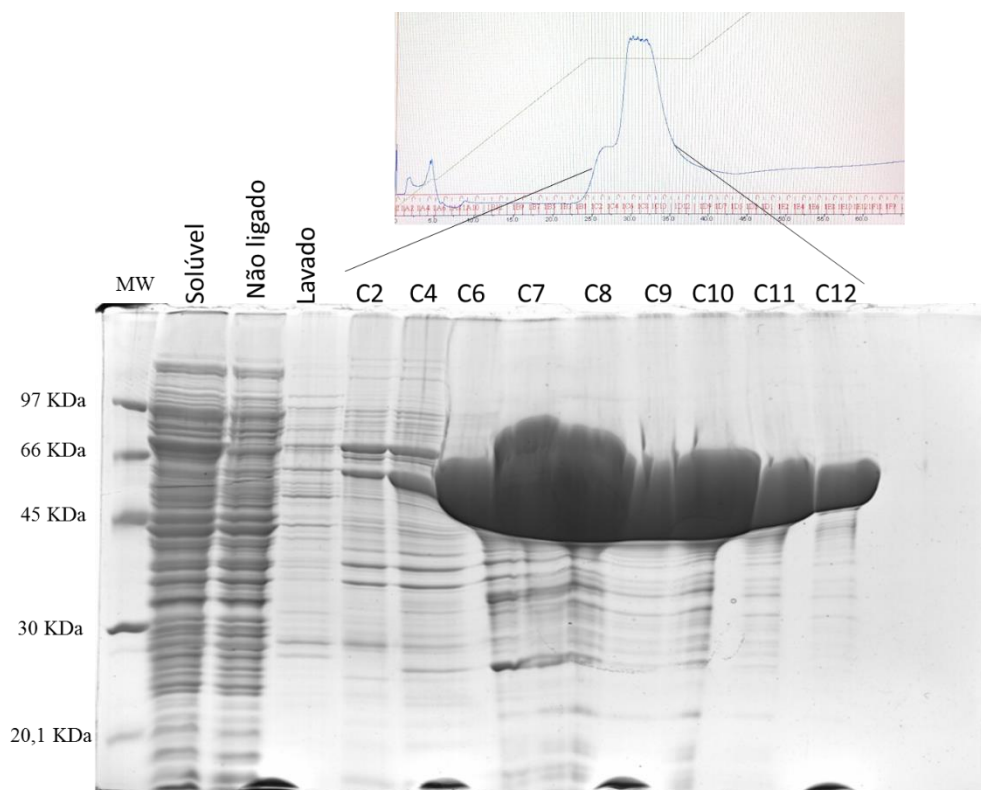


FIGURA 10: PERFIL DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA NADE2 DE *H. seropedicae*.

O extrato celular induzido por IPTG de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pETnadE2Hs para superexpressão da proteína. A purificação foi realizada injetando o extrato induzido solúvel em coluna Histrap HP de 5 mL obtendo alíquotas de 1mL. As proteínas que não ligaram na coluna estão mostradas na fração não ligado. As proteínas ligadas foram eluídas com gradiente crescente de imidazol. As frações foram escolhidas de acordo com o perfil no gráfico do AKTA (acima). As frações C6 a C12 foram reunidas passadas em *desalting*. Análise por SDS-PAGE (15%) e coloração com Coomassie Blue.

6.3 PURIFICAÇÃO DE NadE2-MUTANTE DE *H. seropedicae*

Para confirmar a ausência de atividade *in vitro* mostrada em Laskoski (2010) o plasmídeo pETnadE2 (LASKOSKI, 2010) foi purificado por lise alcalina de uma cultura de *E. coli* TOP 10 contendo esse plasmídeo. O pETnadE2 purificado foi inserido em *E. coli* BL21 (DE3) e as colônias transformadas foram crescidas em meio de cultivo para a superexpressão. O perfil de expressão por IPTG se confirmou e as células foram lisadas e a proteína NadE2-mutante foi purificada através de cromatografia de afinidade utilizando a resina Hi-trap *chelating* carregada com níquel. A NadE2-mutante foi eluída em um pico homogêneo com grande quantidade de proteína em aproximadamente 350 mM de imidazol (FIGURA 11). As frações que possuíam maior pureza foram reunidas e o imidazol foi retirado através de cromatografia de exclusão de massa *desalting*. A proteína pura ficou com uma concentração final de 1 µg/µL.

O rendimento da purificação foi de aproximadamente 20 mg de proteína por litro de cultura.

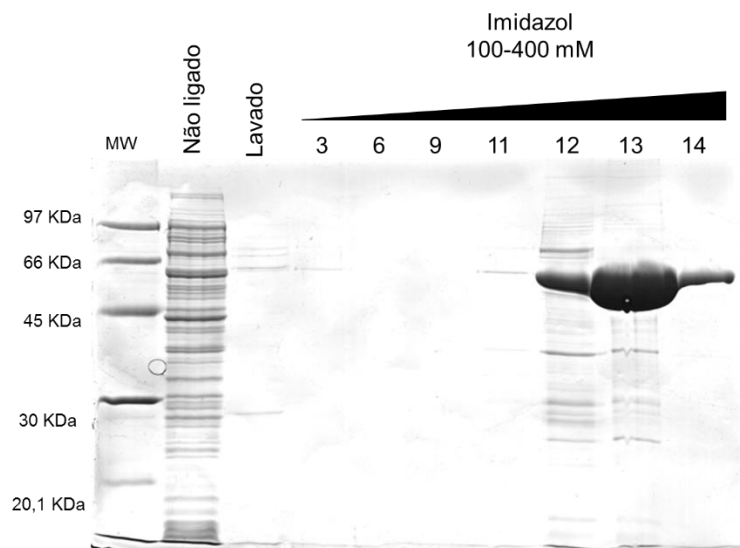


FIGURA 11: PERFIL DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA NADE2-MUTANTE DE *H. seropedicae*.

O extrato celular induzido por IPTG de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pETnadE2 para superexpressão da proteína. A purificação foi realizada injetando o extrato induzido solúvel em coluna Histrap HP de 1 mL obtendo alíquotas de 1mL. As proteínas que não ligaram na coluna estão mostradas na fração não ligado. As proteínas ligadas foram eluídas com gradiente crescente de imidazol. As frações 13 e 14 foram reunidas e o imidazol foi removido em coluna desalting. Análise por SDS-PAGE (15%) e coloração com Coomassie Blue.

6.4 PURIFICAÇÃO DE NadE1-HISTAG DE *H. seropedicae*

O gene *nadE1* foi expresso a partir de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo pETnadE1 e induzida com IPTG. A proteína foi purificada da mesma forma como descrita no trabalho de Laskoski e colaboradores (2016). A NadE1 foi eluída em quase todas as frações, apresentando um pico de eluição próximo a 150 mM de imidazol (FIGURA 12). Ambos, concentração de proteína pura e rendimento da purificação foram menores em comparação a NadE2: 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 2 mg por litro de cultura, respectivamente. Ainda assim, a preparação foi suficiente para os ensaios de atividade e cinética.

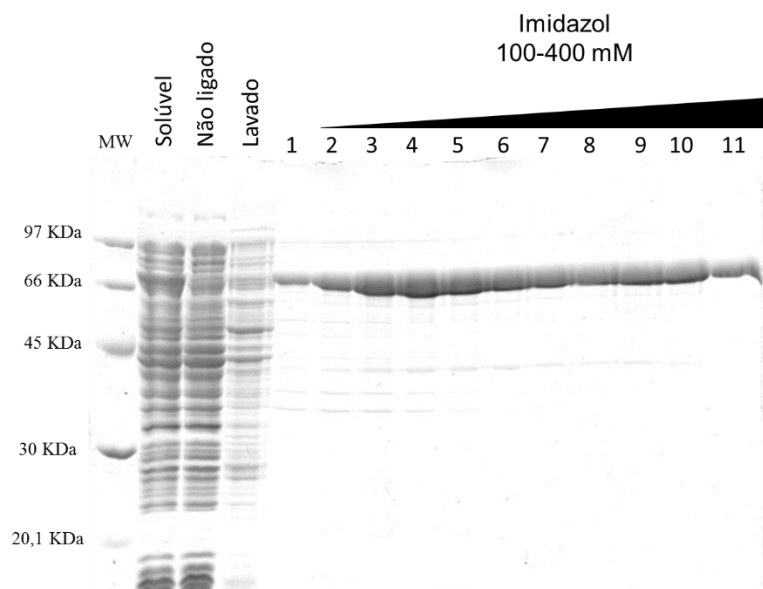


FIGURA 12: PERFIL DE ELUIÇÃO DA PROTEÍNA NadE1-Histag DE *H. seropedicae*.

O extrato celular induzido por IPTG de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pETnadE1 para superexpressão da proteína. A purificação foi realizada injetando o extrato induzido solúvel em coluna Histrap HP de 5 mL obtendo alíquotas de 1mL. As proteínas que não ligaram na coluna estão mostradas na fração não ligado. As proteínas ligadas foram eluídas com gradiente crescente de imidazol. As frações 3, 4, 5 e 6 foram reunidas e o imidazol foi removido em coluna desalting. Análise por SDS-PAGE (15%) e coloração com Coomassie Blue.

6.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO

Para estimar o número de subunidades que compõe a estrutura da NadE1 e NadE2 de *H. seropedicae*, foram realizados ensaios de cromatografia de exclusão molecular com coluna Superose 6. O volume de eluição do Blue Dextran (volume morto) foi de 7 mL. A curva com os padrões de massa molecular conhecida (Gel filtration standard, Sigma) foi utilizada para determinar a massa molecular das proteínas NadE1 e NadE2.

A proteína NadE1 foi eluída com 12,9 mL, que corresponde a uma massa de 575 kDa. Como cada monômero de NadE1 tem aproximadamente 78 kDa, se a NadE1 fosse um proteína (homo)octamérica como outras com domínio glutaminase ela teria aproximadamente 624 kDa. Assim, pode-se considerar que a NadE1 de *H. seropedicae* é uma enzima homooctamérica, pois seu volume de eluição está bem próximo do esperado para uma proteína com oito vezes a massa do monômero de NadE1. No trabalho de Laskoski (2010) essa mesma análise foi feita utilizando a NadE1 e a mesma resina, porém na presença de padrões de marcadores de massa molecular inferiores a 200 kDa.

NadE1-his também foi estimada sendo homooctamérica tendo um volume de eluição de 12,6 mL e massa de 548 kDa (FIGURA 13).

A proteína NadE2 foi eluída em 15,6 mL (FIGURA 14), que corresponde a massa de 80,5 kDa, massa esperada para um monômero 64 kDa. Os resultados de gel filtração foram semelhantes aos encontrados por LASKOSKI (2010). Como não há relatos de enzimas tipo NadE monoméricas, a hipótese mais plausível é que NadE2 de *H. seropedicae* tenha uma configuração homodimérica. Esses resultados são interessantes pois, até então, baseado em resultados de artigos publicados, esperava-se que todas as NAD sintetases com domínio glutaminase fossem homooctaméricas seguindo o padrão descrito em *Mycobacterium*.

A NAD sintetase de *M. tuberculosis* possui domínio glutaminase e foi caracterizada como octamérica. Ela é o principal modelo de NAD sintetase glutamina-dependente (CHUENCHOR et al., 2012). Outras NAD sintetases de procariotos com domínio glutaminase como a de *Cytophaga hutchinsonii* (número PDB 3ILV) e *Burkholderia thailandensis* (número PDB 4F4H), possuem estruturas cristalinas determinadas e depositadas no banco de dados PDB. Estas proteínas têm estrutura quaternária homodimericas. Apesar de estas enzimas terem a estrutura tridimensional conhecida, ambas foram obtidas em abordagens de consórcios de genômica estrutural sem a publicação de qualquer ensaio de atividade enzimática ou funcional (BAUGH et al., 2013). Portanto, até agora, nenhuma glutamina dependente dimérica foi devidamente caracterizada e comprovada. Os estudos tradicionalmente relatam as enzimas NAD sintetases amônia dependentes como homodiméricas.

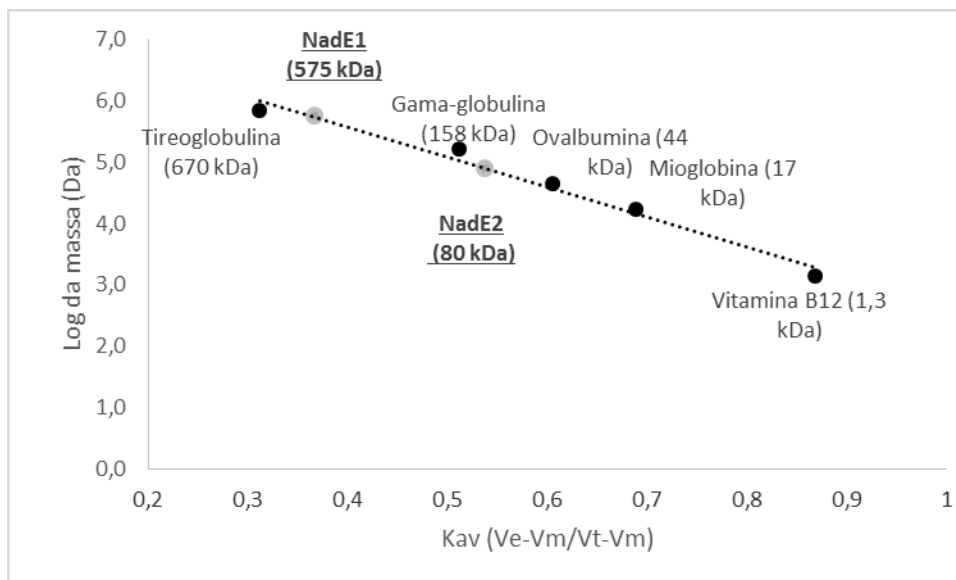


Figura 13: ESTIMATIVA DAS MASSAS DE NadE1 E NadE2 DE *H. seropedicae* POR GEL FILTRAÇÃO.

Esferas negras representam as proteínas padrão utilizadas para construção da curva de calibração da coluna Superose 6. A massa molecular de cada proteína está indicada na figura. Em cinza a estimativa das massas de NadE1 e NadE2 de acordo com seus volumes de eluição. A NadE1 possui uma massa molecular estimada de 575 kDa e a NadE2 possui uma massa molecular estimada de 80 kDa.

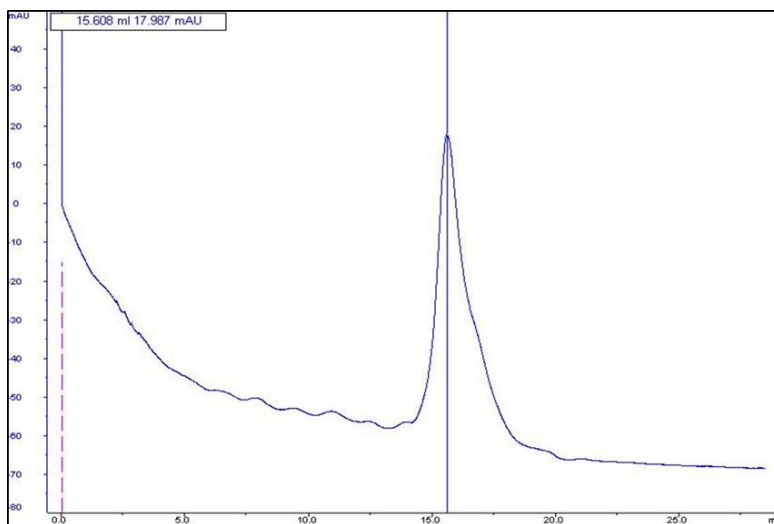


FIGURA 14: PERFIL DE ELUIÇÃO DE NADE2 EM ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE MASSA.

A cromatografia foi realizada por gel filtração em sistema AKTA-FPLC, a linha dividindo o gráfico marca o volume em mL da eluição da proteína NadE2 na coluna Superose 6, de aproximadamente 15,6 mL. A partir desse valor foi calculada a massa de NadE2 por regressão linear de uma curva padrão de proteínas com massa conhecida.

6.6 ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O produto da reação de NAD sintetase não pode ser detectado diretamente, porém sua forma reduzida NADH possui absorção em 340 nm. Portanto, a melhor opção em relação a preço e praticidade foi utilizar a enzima álcool desidrogenase de levedura (ADH) para reduzir o NAD^+ a NADH produzido pela NAD sintetase em um ensaio acoplado. Para tanto, a ADH precisa estar em excesso, pois sua velocidade não pode ser limitante da reação. Ensaio preliminares determinaram que 6 U de ADH seria suficientemente saturante, mesmo valor encontrado por Laskoski (2010). Os substratos da ADH são o NAD^+ e o etanol. O sistema de reação foi preparado e distribuído em placas de 96 poços e a reação foi disparada com a adição de NaAD, glutamina ou amônia.

6.6.1 Curva padrão de NADH

Nos ensaios de atividade enzimática, as concentrações de NADH foram determinadas a partir dos dados obtidos de aumento na absorbância. A absorbância foi convertida em concentração de NADH a partir de uma regressão linear da curva padrão de NADH (FIGURA 15).

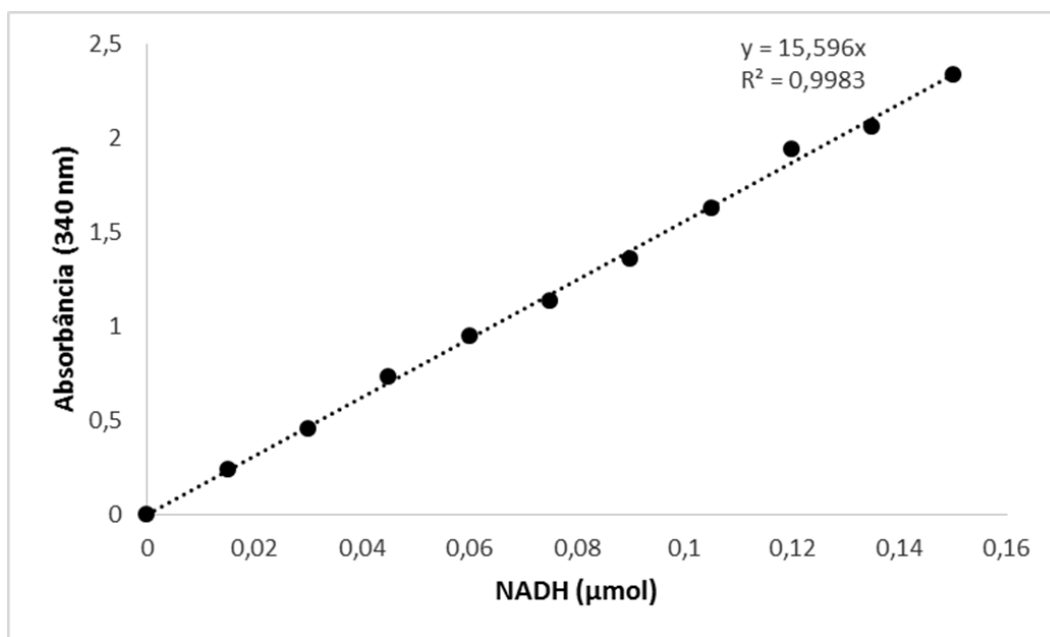


FIGURA 15: CURVA PADRÃO DE NADH.

A curva padrão foi obtida usando o tampão de reação e os componentes usados para a atividade de NadE1/NadE2 somando-se uma determinada concentração de NADH que varia de 0 μM a 500 μM . O valor de absorbância DO_{340} (0,16) com concentração 0 μM de NADH foi

considerado branco da reação e levando em conta o volume da reação de 300µL. A curva gerou uma equação para converter a absorbância obtida em quantidade de produto formado na reação.

6.6.2 Atividade enzimática da enzima NadE2 de *H. seropedicae*

Para verificar a atividade *in vitro* da NadE2 foram realizados ensaios de atividade segundo Laskoski (2010). A absorbância final foi diminuída da inicial, dividida pelo tempo de reação em segundos e depois dividida pela massa em mg de proteína. Foram realizados ensaios com os dois possíveis substratos: 10 mM de glutamina ou 10 mM de amônio. As reações foram realizadas com 10 µg de cada enzima. Como controles, a atividade *in vitro* de NadE2 foi determinada em paralelo com as enzimas NadE1 e NadE2-mutante, que já possui sua cinética determinada e não apresentou atividade *in vitro*, respectivamente (LASKOSKI, 2010). Os sistemas de reação foram distribuídos em microplaca de 96 poços com 300 uL de reação. Os ensaios mostraram que a atividade de NadE1 está confirmada como no trabalho de Laskoski (2010) e o ensaio sem enzima não possui atividade, assim como o ensaio com a NadE2-mutante. Interessantemente, a NadE2 sem mutações apresentou alta atividade nos ensaios com glutamina e amônio. Isso responde nossa pergunta sobre a estrutura e função de NadE2. Podemos concluir que a enzima NadE2 foi clonada sem mutações, possui atividade *in vitro* e pode ser purificada na forma ativa. Portanto, a enzima NadE2 possui massa próxima a massa esperada para a forma dimérica, diferente da NAD sintetase de *M. tuberculosis* e sua cinética deve ser determinada para investigar principalmente sua preferência pelos substratos glutamina e amônia. A ausência de atividade da enzima NadE2 descrita por LASKOSKI 2010 é, provavelmente, resultante das alterações de aminoácidos presentes no clone (FIGURA 8)

6.6.3 Cinética de NadE2

Para determinar os parâmetros cinéticos de NadE2 foram realizados ensaios de atividade utilizando os substratos glutamina e amônio em intervalos entre 2,5 - 10000 µM e 50 - 100000 µM, respectivamente. Os outros substratos foram mantidos em concentração saturante. Os resultados de velocidade inicial e concentração de substrato foram analisados por regressão não-linear e as

constantes cinéticas foram determinadas pelo programa Prisma 5 (FIGURA 16). Dois experimentos independentes foram realizados para a determinação do K_M aparente e V_{max} para a glutamina e para o amônio.

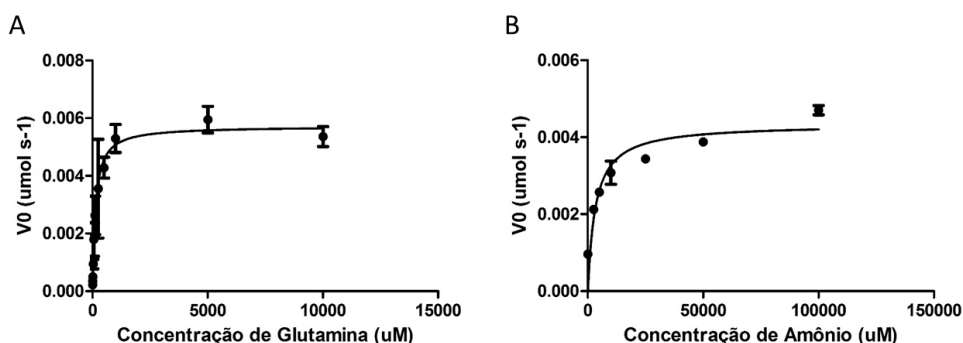


FIGURA 16: VELOCIDADE INICIAL E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO PARA A DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS.

Ensaio realizado utilizando 62 mM TrisHCl pH 8,5, 20 mM de MgCl_2 , 20 mM KCl, 10 mM DTT, 10 mM de ATP e 1 mM de NaAD^+ e 5 μg de NadE2 . Em A, variação do substrato glutamina de 2,5 μM a 0,01 M. A barra de erros representa a variação entre dois experimentos independentes, a linha representa o modelo empregado pelo programa Prism 5 para a determinação dos parâmetros cinéticos. O valor de R^2 do modelo foi de 0,95. Em B, variação do substrato amônio de 50 μM a 0,1 M. A barra de erros representa a variação experimental entre duas replicatas, a linha representa o modelo empregado pelo programa Prism 5 para a determinação dos parâmetros cinéticos. O valor de R^2 do modelo foi de 0,84.

Os resultados de cinética obtidos para a NAD sintetase são semelhantes a outras NAD sintetases glutamina-dependentes descritas na literatura, a preferência pelo substrato foi calculada dividindo os valores de k_{cat}/K_M das diferentes enzimas para os substratos glutamina e amônia (TABELA 7).

TABELA 6: COMPARAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS NAD SINTETASES DE *H. SEROPEDICAE* E OUTROS ORGANISMOS

Organismo	Substrato variável	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot mM^{-1}$)	Preferência de substrato	Referência
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Amônia Glutamina	20 ± 2 $1,3 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$ $0,55 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,02$ $0,42 \pm 0,03$	2,8-vezes Gln>NH ₃	LaRonde-LeBlanc, Resto e Gerratana, 2009
<i>Thermotoga maritima</i>	Amônia Glutamina	$0,33 \pm 0,1$ $0,42 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,04$ $0,288 \pm 0,006$	$0,7 \pm 0,3$ $0,68 \pm 0,08$	0 Gln= NH ₃	Resto, Yaffe e Gerratana, 2009
<i>Thermus thermophilus</i>	Amônia Glutamina	$0,03 \pm 0,01$ $0,73 \pm 0,19$	$0,09 \pm 0,03$ $0,04 \pm 0,01$	3 0,06	50-vezes NH ₃ >Gln	De Ingeniis <i>et al.</i> , 2012
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> NadE1	Amônia Glutamina	$5,7 \pm 0,61$ $0,37 \pm 0,08$	$0,051 \pm 0,001$ $0,03 \pm 0,02$	$0,009 \pm 0,0001$ $0,08 \pm 0,02$	9-vezes Gln> NH ₃	Laskoski <i>et al.</i> , 2016
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> NadE2	Amônia Glutamina	$0,3 \pm 0,09$ $0,13 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,05$ $0,015 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$ $1,16 \pm 0,05$	3,2-vezes Gln> NH ₃	Este trabalho

No trabalho de Resto e colaboradores (2009) o efeito da temperatura foi determinado para a NAD sintetase de *T. maritima*. O ótimo de temperatura para a atividade dessa enzima foi de 80°C. Isso pode ser explicado pelo ambiente em que *T. maritima* vive. No entanto não só a atividade é maior como a preferência pelo substrato glutamina é modificada de acordo com a temperatura. Na temperatura de 37°C, usada para a medição da atividade de NAD sintetases de bactérias patogênicas, a cinética de *T. maritima* fica como mostrado na tabela, os valores cinéticos para amônio e glutamina são próximos o que nos leva a concluir que não há preferência. Porém, quando o ensaio é realizado a 80°C a reação com glutamina fica 20% mais rápida que a amônio dependente (LARONDE-LEBLANC; RESTO; GERRATANA, 2009).

Nesse mesmo trabalho, uma análise filogenética separou as NAD sintetases glutamina dependente em 3 grupos filogenéticos distintos A, B e C. O grupo A que inclui as actinobactérias e proteobactérias patogênicas, proteobactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas de planta, verrucomicrobiota associada a humanos, proteobactérias de solo e clostridia. Grupo B com os organismos eucarióticos, em grupo C estão representados por extremófilos como thermatogae, aquificae, deinococcus-thermus, assim como fixadoras de nitrogênio e bactérias nitrificantes como azotobacter e nitrospira. A NAD sintetase de *T. maritima* pertence ao grupo C. E os autores propõem ainda que as NAD sintetases do grupo C representam a forma mais ancestral de todas as NAD sintetases glutamina-dependentes. Isso porque o grupo C contém organismos como *T. maritima* que são considerados ramos evolutivos muito antigos de procariotos, o que reforça a hipótese de que no grupo C estão as NAD sintetases ancestrais das glutamina dependentes homo-octaméricas. E evidências moleculares apontam que as glutamina dependentes surgiram a partir das amônia dependentes (DE INGENIIS et al., 2012). Considerando isso, pode-se especular que as glutamina dependentes diméricas poderiam representar um grupo ancestral das homo-octaméricas.

A preferência de substrato, calculado a partir da divisão entre os k_{cat}/K_M de NadE2 para a glutamina e para o amônio, mostrado na TABELA 7 para NadE2 de *H. seropedicae* é semelhante a de *M. tuberculosis*. No entanto os k_{cat}/K_M absolutos são diferentes: a NAD sintetase de *M. tuberculosis* possui o k_{cat}/K_M maior e, portanto, é mais específica em catalisar a reação com a

glutamina que NadE2, porém é menos específica que NadE2 para amônio. As duas NAD sintetases de *H. seropedicae* possuem K_M diferentes para glutamina e amônio, para ambos os substratos o K_M é menor que o encontrado para a NadE1. Isso é interessante pois pode levantar questões fisiológicas como qual das NadE de *H. seropedicae* pode ser mais ativa quando as células são cultivadas em diferentes regimes de nitrogênio.

6.6.4 Competição entre os substratos amônia e glutamina por LC/MS

As NAD sintetases podem utilizar glutamina ou amônio como substrato, sabe-se que as NAD sintetases de *H. seropedicae* possuem domínios glutaminase e que NadE1 possui coeficiente de especificidade k_{cat}/K_M para a glutamina de $7,9 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ e para o amônio $0,02 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$. O que significa que a NadE1 é 9 vezes mais específica para a glutamina que amônia. Para confirmar a preferência de NadE1 por glutamina em relação a amônia, experimentos foram realizados para quantificar a incorporação de ^{15}N marcado em competição com diferentes concentrações de ^{14}N glutamina. A porcentagem relativa de incorporação de amônia ou glutamina foi detectada por análise LC/MS. Quando $0,2 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$ foi combinado com 2 mM de glutamina, $<5\%$ do NAD^+ produzido por NadE1 foi originado do amônio como doador de N. Quando amônio e glutamina foram combinados ambos com 2 mM , somente 18% do NAD^+ produzido por NadE1 foi originado do amônio como doador de N (FIGURA 17).

Esses resultados confirmam que NadE1 de *H. seropedicae* usa preferencialmente glutamina como substrato. Mesmo quando a concentração de amônio foi 10 vezes maior que glutamina, ainda, aproximadamente 80% do NAD^+ produzido por NadE1 provém da glutamina. Como perspectiva, pretende-se utilizar o ensaio com LC/MS para investigar a preferência de substrato por NadE2.

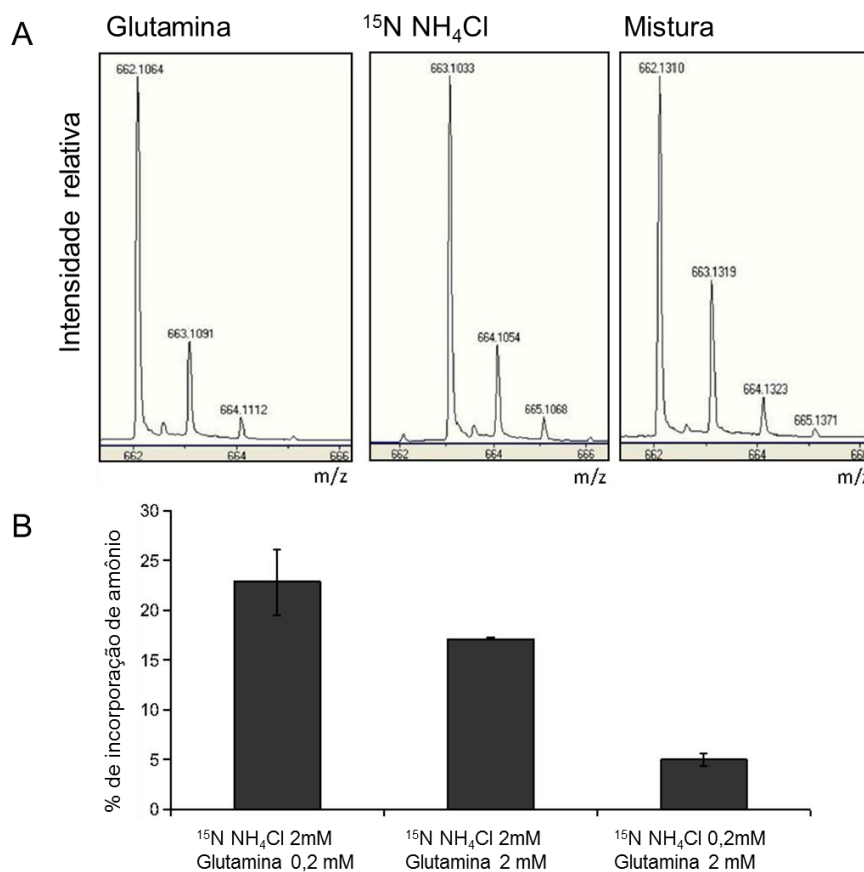


FIGURA 17: COMPETIÇÃO ENTRE AMÔNIO E GLUTAMINA COMO SUBSTRATO NA REAÇÃO DE NAD⁺.

A) Espectro de massa de NAD⁺ obtido usando glutamina ^{14}N como substrato, ^{15}N amônio ou uma mistura de ambos. B) Porcentagem relativa da incorporação de ^{15}N proveniente do amônio comparado com o ^{14}N proveniente da glutamina pela NadE1. O cálculo foi feito baseado no aumento da intensidade do pico de m/z 663,01 como descrito em materiais e métodos. O resultado é uma média de dois experimentos independentes e as barras de erro representam a variação experimental.

6.7 PURIFICAÇÃO DE P_{II} HISTAG

Os genes *glnB* e *glnK* foram expressas a partir de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo sem nome e p_{glnBHs} e induzida com IPTG. As proteínas foram purificadas da mesma forma como descrita no trabalho de Moure e colaboradores (2012). A GlnB e GlnK foram eluídas com aproximadamente 120 mM de imidazol (FIGURA 18). Durante a purificação as proteínas precipitaram, então foram centrifugadas a 30000 rpm por 10 minutos. O rendimento de aproximadamente 7 e 4,5 mg por litro de cultura para a GlnB e GlnK, respectivamente.

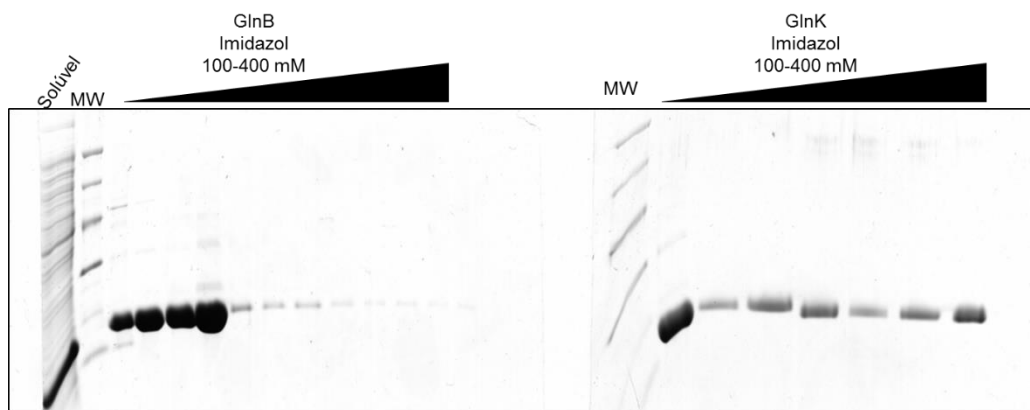


FIGURA 18: PERFIL DE ELUIÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB E GlnK DE *H. seropedicae*. A purificação foi realizada injetando o extrato induzido solúvel em coluna Hitrap HP de 5 mL obtendo alíquotas de 1mL. As proteínas ligadas foram eluídas com gradiente crescente de imidazol. As frações com proteína com maior pureza foram reunidas passadas em desalting. Análise por SDS-PAGE (15%) e coloração com Coomassie Blue.

6.8 ENSAIO DE INTERAÇÃO FÍSICA ENTRE NAD SINTETASE E P_{II}

A interação física entre a proteína NadE1 de *H. seropedicae* e as proteínas P_{II} foi investigada através do ensaio de co-precipitação ou *pull down* usando as proteínas NadE1-Histag e NadE1 nativa a partir do extrato de indução, assim como com as P_{II}-Histag e nativas uridililadas ou não. Além dos tampões de interação foram adicionados os efetores 1 mM de ATP, 1 mM de ADP ou 1 mM de ATP + 1,5 mM de 2-OG. Estes efetores causam mudanças conformacionais em P_{II} que podem ser cruciais para a interação dela com seus alvos. O resultado esperado no caso de interação positiva, seria a ligação da proteína isca His-tag na resina magnética, assim como a ligação da proteína nativa (chamada de presa) que também se ligaria na resina por intermédio de interação com a proteína Histag imobilizada na resina. Assim, em caso de interação física positiva, seria esperada a visualização de bandas em um gel de poliacrilamida, referentes às proteínas His-tag (isca) e nativa (presa).

Os primeiros ensaios de interação foram feitos com 50 µg NadE1-Histag e 20 µg das proteínas GlnB e GlnK nativas (uridililada e não uridililada) testando a presença dos detergentes LDAO ou TWEEN 20 a 0,05% (v/v), pois a adição de detergentes previne a formação de ligações inespecíficas entre a proteína nativa e a resina. Porém os resultados obtidos não mostraram interação entre NadE1 e P_{II} para nenhum dos efetores testados (dados não mostrados).

Em seguida foi testada a co-precipitação sem a adição de detergentes. O que se observou foi que as PII nativas foram capazes de se ligar inespecificamente na resina o que dificultou a interpretação dos resultados. Vale ressaltar que em experimentos realizados com a proteína GlnB na presença de ADP, GlnB foi precipitada com maior intensidade na resina quando NadE1-His estava presente em comparação aos controles sem a adição da proteína isca NadE1-His (Figura 19). Infelizmente estes dados não foram reprodutíveis quando diferentes preparações de NadE1-His foram utilizadas. Também foram realizados testes na condição 1 mM ATP com 1,5 mM de 2-OG (dados não mostrados).

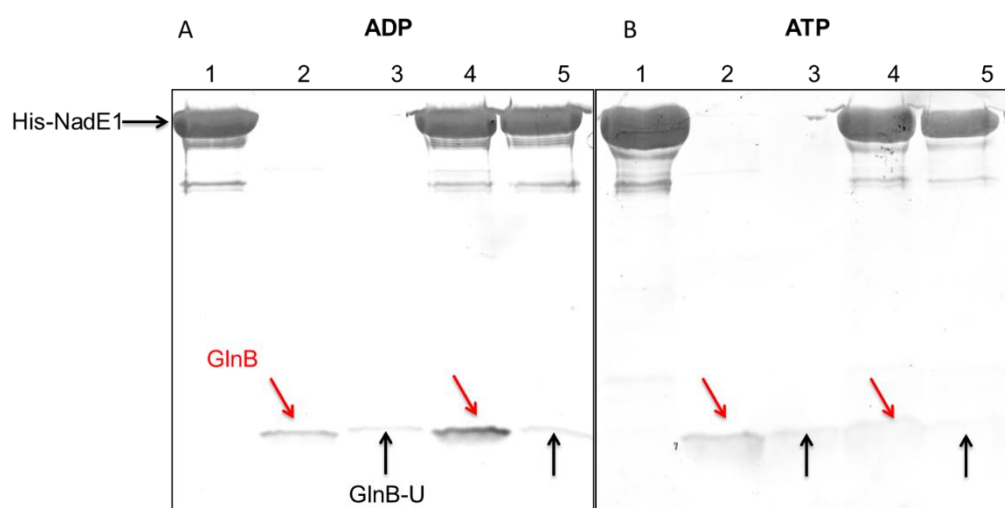


FIGURA 19: ENSAIO DE CO-PRECIPITAÇÃO DE NadE1-HISTAG E GlnB NA CONDIÇÃO DE ADP E ATP.

A interação foi realizada através de co-precipitação em resina carregada com níquel. As reações foram realizadas na presença de 1 mM de ADP (A) ou 1 mM de ATP (B). As setas indicam as proteínas identificadas. Linha 1, controle adicionando somente NadE1-Histag. Linha 2, controle adicionando somente GlnB. Linha 3, controle adicionando somente GlnB-uridililada. Linha 4, co-precipitação de NadE1 com GlnB. Linha 5, adicionando NadE1 e GlnB-uridililada.

A proteína GlnK e GlnK-uridililada também foi testada nas mesmas condições e não apresentou co-precipitação. Outros ensaios realizados adicionando 1 mM de glutamina ou 1 mM de DTT também gerou resultados não reprodutivos. Porém, nenhuma das modificações foi capaz de confirmar a co-precipitação de GlnB.

Como alternativa foram testados ensaios com tampão de interação nos pH 6,8, pH 7,5 e pH 8,8. Nenhum apresentou co-precipitação tanto GlnB quanto com GlnK (uridililadas ou não). Depois de testar todas as condições exaustivamente a outra alternativa foi utilizar as PII-Histag com um ensaio de

co-precipitação com extrato de *E. coli* BL21 (DE3) com superexpressão de NadE1 nativa. Um ensaio preliminar mostrou que NadE1 nativa não foi capaz de co-precipitar com GlnK e GlnB-His nas condições ADP, ATP e ATP com 2-OG (dados não mostrados).

Outros testes são necessários para investigar se as NAD sintetases interagem com PII. A NadE2 não foi incluída nesses ensaios e poderia ser testada. Alternativamente, ensaios que testem a interação *in vivo* como o ensaio de duplo-híbrido poderiam ser feitos caso a interação *in vitro* não seja possível, ou ainda um ensaio de FRET caso a interação entre as duas proteínas seja de baixa afinidade.

6.9 ANÁLISES DE SEQUÊNCIA

Sequências de NAD sintetases glutamina dependentes dos organismos *M. tuberculosis*, *H. seropedicae*, *C. hutchinsonii*, *T. maritima*, *B. thailandensis* retiradas do banco de dados Uniprot foram alinhadas usando o programa ClustalW2 para determinar a identidade e a relação filogenética. A proteína que teve mais identidade com a NadE1 foi a NAD sintetase de *M. tuberculosis*, com 52,65% de identidade. Enquanto que a NadE2 teve maior identidade com as enzimas *T. maritima*, *B. thailandensis* (aproximadamente 40%). A árvore filogenética da FIGURA 20 revela que dentre as sequências alinhadas, a NadE1 e a NadE de *M. tuberculosis* foram aproximadas em um único ramo. Desse ramo parte a NadE de *C. hutchinsonii*. As NadE de *T. maritima*, *B. thailandensis* formam um único ramo, distante do ramo Mt-Hs1, e como um ramo separado de todos a NadE2.

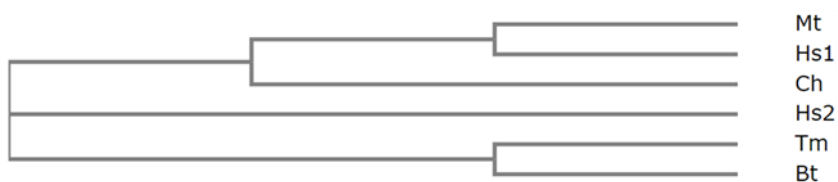


FIGURA 20: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE NAD SINTETASE.

Sequências de NAD sintetase de Mt, *Mycobacterium tuberculosis* (A0A0E7XKF2); Hs1, NadE1 de *H. seropedicae* (D81S59); Ch, *Cytophaga hutchinsonii* (Q11SE1); Hs2, NadE2 de *H. seropedicae* (D81X05); Tm, *Thermotoga maritima* (Q9X0Y0); Bt, *Burkholderia thailandensis* (Q2T061) foram obtidas do Uniprot e alinhadas usando ClustalW2. A árvore filogenética foi construída usando máxima verossimilhança pelo programa MEGA 6.

Como pode ser observado no alinhamento de sequências (FIGURA 21) ambas as NAD sintetases de *H. seropedicae* apresentam a tríade catalítica de

hidrólise da glutamina. Os resultados cinéticos concordam com a análise de sequência de que as duas NadEs podem usar tanto amônia quanto glutamina como substrato.

A estrutura de *M. tuberculosis* revela que as α -hélices 18 e 20 são importantes para a organização oligomérica (LARONDE-LEBLANC; RESTO; GERRATANA, 2009). A sequência de NadE1 possui sequências que alinham a essas regiões com algumas substituições, enquanto que NadE2 não teve alinhamento para essas regiões. Estes dados suportam a observação de que NadE2 tem uma organização oligomérica distinta de NadE1. De fato, as NAD sintetases de *C. hutchinsonii* e *B. thailandensis*, também classificadas como glutamina-dependentes e que tem estrutura cristalográfica resolvida, não possuem alinhamento nas regiões α -hélices 18 e 20 de *M. tuberculosis* e apresentam organização oligomérica homo-dimérica.

Os aminoácidos de *M. tuberculosis* para o túnel de amônia são conservados na NadE1. As duas ainda compartilham a característica de serem octaméricas. É de se especular que o túnel de amônia para a NadE1 seja semelhante estruturalmente ao de *M. tuberculosis*, talvez até conectando duas subunidades diferentes (FIGURA 3). A NadE2 compartilha somente 5 dos 14 aminoácidos assinalados para o túnel de amônia. Para a NadE de *T. maritima*, a cinética demonstrou um pobre sinergismo entre o domínio glutaminase e o sintetase (RESTO; YAFFE; GERRATANA, 2009). Informações sobre o túnel de amônia ou glutamina em NAD sintetases glutamina-dependentes diméricas ainda não foram investigados. A determinação da estrutura 3D de NadE2 seria importante para auxiliar a compreensão desta enzima e é uma de nossas perspectivas.

Analisando as mutações presentes no clone de NadE2 do trabalho de LASKOSKI (2010) de *H. seropedicae*. Das 4 mutações, somente duas se localizam em regiões conservadas: Q475R, nessa posição é possível que a NadE2-mutante tenha perdido uma região importante para a atividade catalítica. Todas as NAD sintetases utilizadas no alinhamento possuem esse resíduo conservado. Acredita-se que a glutamina dessa posição é responsável pelo sítio ativo do domínio sintetase (LARONDE-LEBLANC; RESTO; GERRATANA, 2009). Portanto, a mutação desse resíduo poderia explicar a ausência de atividade de NadE2-mutante.

```

Mt      --MNFYSAYQHGFVRVAACHTHTTIGDPAANAASVLDMARACHDDGAALAVFPELTLISGY
Hs1     MQSPFFNLYSHGFARVAVVPDCKVADPGFNAQRTIALAEQAAARGAVLVSFPELGLSAY
Ch      -----MSTIRIGGAAVNQTPIDWENNKNILDAIEEAKNANVEILCLPELCITGY
Hs2     -----MLRTAIAQCNPITIGDFEENLALHLDGLQRAAQAGADLVVFPELSICGY
Tm      -----MKRLRVTLAQLNPTLGD FEGNLLKKAIEALRVAEDRGSDLLVFPFLPGY
Bt      -----MKTRIALAQLNVTVGDFAGNVAKIVAAAQAAHDAGAHFLIAPELALSGY

```

```

Mt      SIEDVLLQDSLLDAVEDALLDLVTESADLLP-VLVVGAPLRHRH-----
Hs1     SCEDLFQQRALLDASLQALQSVLEASMRIPA-ALIVGLPLKVDH-----
Ch      GCEDLFLTDWVAETAIEYCFEIAA---SCTDITVSLGLPMRIAG-----
Hs2     YPGDLLLEEARFLDRAEATLQDVIDATRRLPGLTAVIGAPRRNPG-----PGK
Tm      PPEDLMLRLSFLRENRYLQKFAQHTRN-LGVTVLMGFI-----DSDE
Bt      PPEDLLLRLPAFYAASDAALAEALAAQLKPFAGLAVLVGHPLRAPSDGNANRAIERGVPPV

```

```

Mt      RIYNTAVVIHRGAVLGVPVPSYLPPTYREFYERQMAPGDGE-RGTIRIGGADVAFGTDLL
Hs1     QLYNCAVVLHHGRILGVVPKSYLPNYSEFYEARQFSSADCAVTRSVHLLGQEVGFGSHLL
Ch      ITYNCVCLVENCIVKCFSAQFLANEGVHYETRWFTAWPRNHTTTFLYNDVKYPFGDV--
Hs2     PLENALLAVREGRIVAEYHKQLLPVYGVFDDGRHFEAGPET-----AC--
Tm      DAYNAAAVVKDGEILGVYRKISLPNYGVFDERRYFKPGEE-----LL--
Bt      DTYNAASLIVGGEVACTYRKQDLNTEVFDEKRYFATDAA-----PY--

```

```

Mt      FAASDLPGFVLHVEICEDMFVPMPPSAEA-----ALAGATVLANLSGSPITIGRAEDRR
Hs1     FEIRNIPDFRFHIEICEDVWVPIPPSSFA-----ALAGATVLNLSASNIVVGKSGYRH
Ch      --LYNVKDARIGFEICEDAWRTDRVGRH-----YEKGATLVNPSASHFAFGKSAIRY
Hs2     --VLPLKGMRVGFLICEDGWNDLRSYRVNPFELQAQADAQLVVSINASPSDVGKRSQRH
Tm      --VVKIGNIKVGVTICEDIWNPVEPSASLS-----LGEVHGLIANLSASPHYVGKPVLRK
Bt      --VFELNGVKFGVVICEDVWHASAAQLA-----KAAGAQLVLPNGSPYHMNKDAVRI

```

```

Mt      LLARSASARCLAAVYAAAGEGESTTDLAWDGQTMIWENGALLAESERFPKGVRRSVADV
Hs1     QLVSQQSARCLAAVLYSSAGNGESTTDLAWDGQALICENGELLAESERFAQGGHVIYADV
Ch      DLVIGGSERFDCITYVANLLGNEAG-RMIYDGEVLIAHKGLIQRNDRLSFKNVNLIYA-
Hs2     ALFQAACLRRQMALLYVNQVGGQDQ-LVYDGGSFAMSPLOGLAFEAAARLAEDFQVLAFEG
Tm      DYLSMKAYDYHVAMAYCNMVGGOQE-LVFDGGSMVVDASGEVINYGKLFEEIIITVDLDDL
Bt      DILRARIRETGLPMVYNLVGGQDE-LVFDGGSFVLDGAGELVAKMPQFEENAIIVEFDG

```

```

Mt      DTELLRSERLRMGTFFDNNRRHHRELTESFRRIDFALDPPA-GDIGLLREVERFPFVPADP
Hs1     DLERLSRERFHQTTFGQSVRRHADEVRRFEVVGFEVQIPQQQALPLQRRVARFPYVPANA
Ch      -----DI-----ATDSAETPET-VLT
Hs2     GRF-----LRSDGVG-----APQ--C-I
Tm      DEN-----LRVSLVDPRRRYMK-----TQNYPVKTVEAG--NLREKSGHFEP--V-V
Bt      ARA-----LPA--A-I

```

```

Mt      QRLQQDCYEAYNIQVSGLEQRLRALDYPKVVIGVSGGLDSTHALIVATHAMDRE-----
Hs1     EQRELRCREVYSIQVQALVQRLSSAGLKKVVIGVSGGLDSTHALLVCAKAMDKL-----
Ch      QDDLEKEFEFEWATSIGLFDYMRKSRSKGFVLSLSSGGADSSACAIMVAEMIRKGLKELGL
Hs2     DQTMATPEFHRRQILLGLRDYARRCGFGKVVVGS SGGIDSAVTIALAAEALGA-----
Tm      NPLPVREEEMFRALITGLRDYVRKNGFEKVVIGLSSGMDSSLVAVIATEALGK-----
Bt      APALSVEAQVYRALVLGVRDYIGKNGFPGAIIGLSSGVDSALVLAVDALGA-----

```

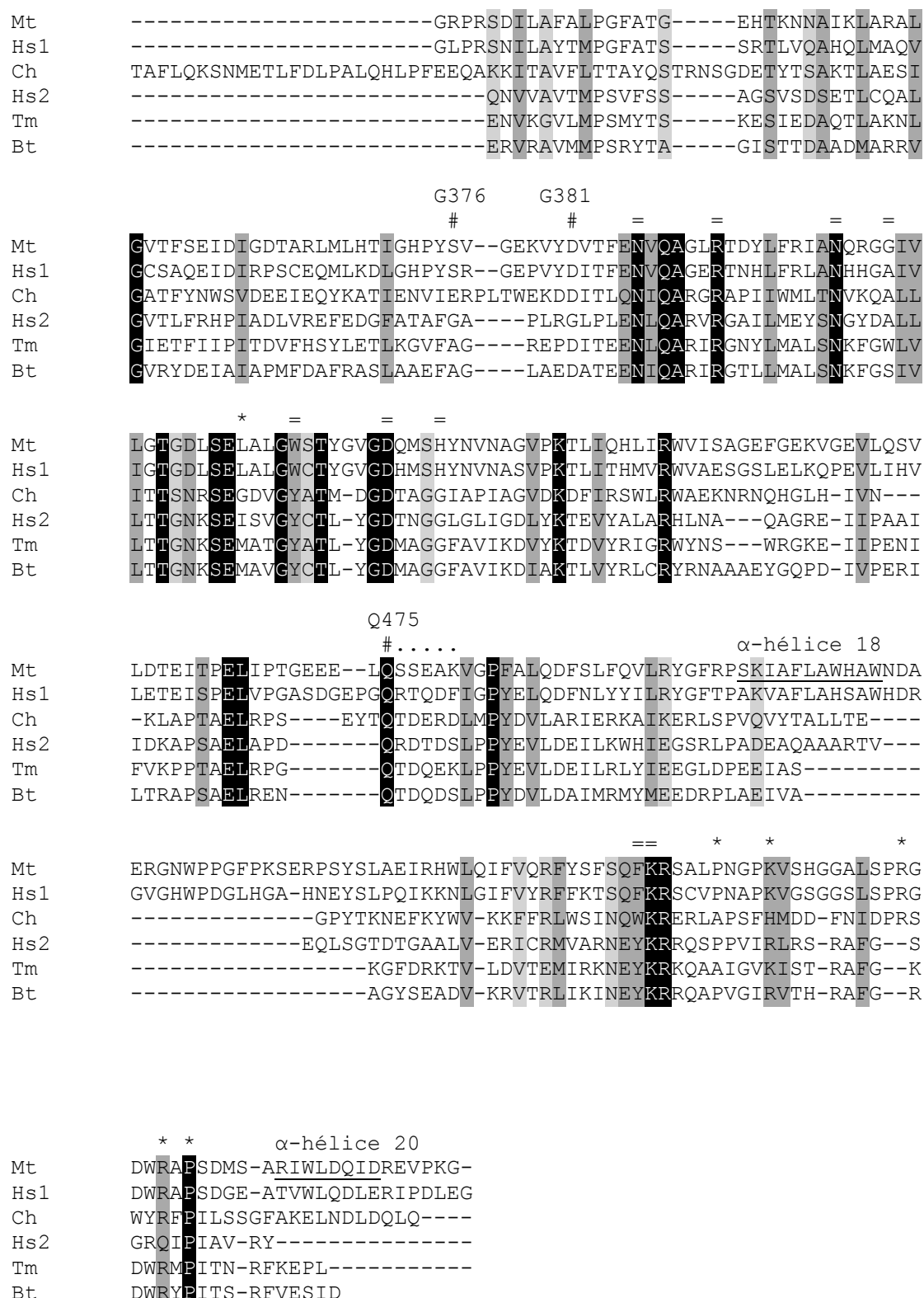


FIGURA 21: ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE NAD SINTETASE DE DIFERENTES ORGANISMOS.

Sequências de NAD sintetases glutamina dependentes foram retiradas do UniProt e alinhadas usando ClustalOmega. Mt, *Mycobacterium tuberculosis* (A0A0E7XKF2); Hs1, NadE1 de *H. seropedicae* (D81S59); Ch, *Cytophaga hutchinsonii* (Q11SE1); Hs2, NadE2 de *H. seropedicae* (D81X05); Tm, *Thermotoga maritima* (Q9X0Y0); Bt, *Burkholderia thailandensis* (Q2T061). Resíduos importantes foram marcados acima baseados em informações estruturais de NAD

sintetase de *M. tuberculosis*. A tríade catalítica do domínio glutaminase é indicada por +; resíduos envolvidos na ligação ao NaAD são indicados por =; Resíduos conservados do túnel de amônia são indicados por *; as mutações encontradas em NadE2-mutante estão indicadas por #. Duas regiões α -hélices (18 e 20) estão sublinhadas e indicadas.

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho a NadE2 de *H. seropedicae* foi clonada com seis aminoácidos de histidina na porção N-terminal. A NadE2 anteriormente caracterizada como não funcional *in vitro* (LASKOSKI, 2010), na verdade, possuía quatro substituições de aminoácidos que provavelmente comprometeram a atividade da enzima. A alteração na posição 475 do aminoácido glutamina, conservado em procariotos, é a mais sugestiva para ter ocasionado perda completa de atividade da NadE2, pois acredita-se que seja responsável pelo sítio catalítico do domínio sintetase (DEVEDJIEV et al., 2001; SYMERKY et al., 2002). No entanto, não há como estabelecer a influência das outras alterações para a atividade catalítica e estrutura da NadE2.

Uma análise de cromatografia de gel filtração revelou que a massa de NadE2 é muito próxima da esperada para a organização oligomérica na forma de dímero. Esse resultado é interessante pois diferencia estruturalmente as duas NadE presentes em *H. seropedicae*: a NadE1 possui organização estrutural homooctamérica, possuindo estrutura e sequência semelhantes a NAD sintetase de *M. tuberculosis*; enquanto que a NadE2 se encontra em estado dimérico e possui mais semelhanças em estrutura e sequência com as NadE de *T. maritima*, *C. hutchinsonii* e *B. thailandensis*. Não há referência para a organização oligomérica de *T. maritima*, porém as estruturas submetidas no banco de dados do PDB de *C. hutchinsonii* e *B. thailandensis* demonstram que é possível existir NAD sintetases dimérica que usam glutamina como substrato.

A caracterização cinética de NadE2 revelou que esta proteína possui preferência de substrato para a glutamina na mesma proporção de NadE de *M. tuberculosis*. Embora sutil, ela é semelhante a preferência de NadE1 e possui K_M inferior a NadE1 tanto para glutamina quanto para amônio. Outros estudos são necessários para investigar o papel das duas NadE em *H. seropedicae*.

Um experimento de competição de substrato confirmou a preferência de NadE1 por glutamina em relação a amônia, por LC/MS, essa técnica já foi aplicada com sucesso para outras amidotransferases (EVANS et al., 2002; YAMADA et al., 2006). Com a confirmação de que NadE1 utiliza

preferencialmente glutamina, torna-se interessante a investigação da utilização desse substrato *in vivo* e a elucidação de mecanismos de regulação do metabolismo do nitrogênio (VAN HEESWIJK; WESTERHOFF; BOOGERD, 2013).

A análise de sequência demonstrou que os aminoácidos presentes no túnel de amônia da NadE de *M. tuberculosis* (LARONDE-LEBLANC; RESTO; GERRATANA, 2009) estão presentes também na sequência de NadE1, com algumas substituições, sugerindo que a enzima NadE1 além de compartilhar a estrutura octamérica com NadE de *M. tuberculosis*, pode também possuir a estrutura do túnel de amônia inter-subunidade. Informações sobre a existência de túnel de amônia nas NAD sintetases diméricas ainda faltam na literatura. Perspectivas de determinar a estrutura 3D de NadE1 e NadE2 poderiam contribuir no estudo do sinergismo entre os domínios das NAD sintetases e até mesmo de outras amidotransferases. A NadE de *T. maritima* possui um pobre sinergismo entre os domínios glutaminase e sintetase, ou seja, uma parte da amônia gerada pela hidrólise da glutamina no domínio glutaminase é perdida para o meio por difusão sem que seja aproveitada pelo domínio sintetase (RESTO; YAFFE; GERRATANA, 2009). Outros estudos cinéticos de NadE1 e NadE2 podem aprofundar o entendimento da atividade e função dessas proteínas.

Para a NadE2, as duas α -hélices 18 e 20 indicadas na FIGURA 21, que formam contatos para a montagem homo-octamérica, não estão presentes. As NadE de *C. hutchinsonii* e *B. thailandensis* também não apresentam essa região, reforçando a hipótese de que essa região seja a responsável pela formação da estrutura octamérica. NadE2 de *H. seropedicae* é a primeira enzima glutamina-dependente com organização homo-dimérica caracterizada cineticamente. Pouco se sabe sobre que consequências para o metabolismo essa diferença pode acarretar.

A presença de múltiplas formas de NAD sintetases é um campo interessante para estudos sobre a origem e evolução das NAD sintetases em procariotos. Acredita-se que as enzimas NAD sintetases glutamina-dependentes surgiram da fusão genética dos domínios glutaminase e sintetase, a partir de um ancestral amônia-dependente (DE INGENIIS et al., 2012). Esta hipótese é suportada pela identificação em *T. thermophilus* de uma NAD

sintetase que pode representar um estágio intermediário evolutivo entre enzimas amônia e glutamina dependentes, a NadE de *T. thermophilus* possui os domínios sintetase e glutaminase em diferentes cadeias polipeptídicas que se agrupam após a tradução para, que forma uma NAD sintetase glutamina-dependente hetero-oligomérica.

É tentador especular que as NAD sintetases glutamina-dependentes diméricas seriam um intermediário evolutivo entre NAD sintetases homodiméricas amônia-dependente e NAD sintetase octaméricas glutamina dependente como NadE1 de *H. seropedicae* e a de *M. tuberculosis*. A caracterização de novas NAD sintetases de diferentes organismos e análises de bioinformática podem auxiliar na elucidação da história evolutiva deste grupo primitivo de enzimas.

Infelizmente, não se pôde confirmar a interação de NadE1 com as proteínas P_{II} por ensaio de co-precipitação. Apesar do resultado negativo, ainda é possível que NadE seja alvo de P_{II}. No ensaio de interação a cauda His da NadE1, utilizada para imobilizar a proteína isca na resina magnética, pode interferir diretamente na interação proteína-proteína. Em ensaios futuros a NadE2 pode ser testada em ensaio de co-precipitação, e avaliada a atividade enzimática na presença de P_{II}.

8 CONCLUSÃO

A clonagem do gene *nadE2* no vetor pET28a foi realizada;

O gene *nadE2* de Laskoski (2010) possuía mutações que poderiam interferir na atividade da enzima que ele codifica;

A proteína NadE2-histag foi expressa e resultou em grande quantidade de proteína do tamanho esperado, aproximadamente 64 KDa;

A proteína NadE1-Histag foi purificada com os mesmos resultados de Laskoski (2010);

A preferência de NadE1 por glutamina foi confirmada em ensaio de LC/MS;

A proteína NadE2 possui k_m de 0,13 mM para a glutamina e 0,3 para a amônia;

Outros ensaios precisam ser realizados para determinar como ocorre a regulação de NadE1 e NadE2;

NadE2 é a primeira NAD sintetase glutamina dependente não octamérica caracterizada cineticamente;

NadE2 possui características intermediárias evolutivamente, o que pode lançar luz nos estudos evolutivos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, F. P. DO et al. Gene expression analysis of maize seedlings (DKB240 variety) inoculated with plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **Symbiosis**, v. 62, p. 41–50, 2014.
- ARAÚJO, A. E. D. S. et al. Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 49–55, fev. 2013.
- ARAÚJO, É. D. O. et al. Inoculation of *Herbaspirillum seropedicae* in three corn genotypes under different nitrogen levels. **African journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 21, p. 1628–1634, 2014.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 65, n. 1, p. 80–105, mar. 2001.
- BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86–93, 1986.
- BASTIÁN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A 1 and A 3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7–11, 1998.
- BAUGH, L. et al. Combining Functional and Structural Genomics to Sample the Essential Burkholderia Structome. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- BELLINZONI, M. et al. Glutamine amidotransferase activity of NAD⁺ synthetase from *Mycobacterium tuberculosis* depends on an amino-terminal nitrilase domain. **Research in microbiology**, v. 156, n. 2, p. 173–7, mar. 2005.
- BI, J.; WANG, H.; XIE, J. **Comparative genomics of NAD(P) biosynthesis and novel antibiotic drug targets** *Journal of Cellular Physiology*, 2011.
- BONATTO, A. C. Caracterização in vitro da modificação pós-traducional das proteínas GlnB e GlnK de *Herbaspirillum seropedicae*. **In Vitro**, p. 109, 2007.
- CANELLAS, L. P. et al. A combination of humic substances and *Herbaspirillum*

seropedicae inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, n. 1-2, p. 119–132, 23 ago. 2013.

CHELLAMUTHU, V. R. et al. A widespread glutamine-sensing mechanism in the plant kingdom. **Cell**, v. 159, n. 5, p. 1188–1199, 2014.

CHUBATSU, L. S. et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 197–207, 27 maio 2011.

CHUENCHOR, W. et al. Regulation of the intersubunit ammonia tunnel in *Mycobacterium tuberculosis* glutamine-dependent NAD⁺ synthetase. **The Biochemical journal**, v. 443, n. 2, p. 417–26, 15 abr. 2012.

DE INGENIIS, J. et al. Glutamine versus ammonia utilization in the NAD synthetase family. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39115, jan. 2012.

DEVEDJIEV, Y. et al. Stabilization of active-site loops in NH₃-dependent NAD⁺ synthetase from *Bacillus subtilis*. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 57, n. 6, p. 806–812, 25 maio 2001.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–31, ago. 2004.

EVANS, J. et al. LC/MS analysis of NAD biosynthesis using stable isotope pyridine precursors. **Analytical biochemistry**, v. 306, n. 2, p. 197–203, 2002.

FORCHHAMMER, K. P(II) signal transducers: novel functional and structural insights. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 2, p. 65–72, mar. 2008.

FORCHHAMMER, K.; LÜDDECKE, J. Sensory properties of the PII signalling protein family. **The FEBS journal**, v. 283, n. 3, p. 425–37, fev. 2016.

GERHARDT, E. C. M. **Identificação e estudo in vitro da interação de proteínas PII de *Azospirillum brasilense* com proteínas alvo**. [s.l: s.n.].

HILL, S. How is nitrogenase regulated by oxygen? **FEMS microbiology reviews**, v. 4, n. 2, p. 111–29, 1988.

HIREL, B. et al. Improving Nitrogen Use Efficiency in Crops for Sustainable Agriculture. **Sustainability**, v. 3, n. 12, p. 1452–1485, 7 set. 2011.

HUERGO, L. F. et al. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in

Azospirillum brasilense is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 1, p. 326–37, jan. 2006.

HUERGO, L. F. et al. Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* reveals ammonium-induced AmtB-dependent membrane sequestration of PII proteins. **FEMS microbiology letters**, v. 308, n. 1, p. 40–7, 1 jul. 2010.

HUERGO, L. F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 2, p. 251–83, mar. 2013.

JAMES, E. K. et al. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 308, p. 785–797, 1997.

JAMES, E. K. et al. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 15, n. 9, p. 894–906, set. 2002.

JAUCH, R. et al. Structures of *Escherichia coli* NAD synthetase with substrates and products reveal mechanistic rearrangements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 15131–15140, 2005a.

JAUCH, R. et al. Structures of *Escherichia coli* NAD synthetase with substrates and products reveal mechanistic rearrangements. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 15, p. 15131–40, 15 abr. 2005b.

JAVELLE, A; MERRICK, M. Complex formation between AmtB and GlnK: an ancestral role in prokaryotic nitrogen control. **Biochemical Society transactions**, v. 33, p. 170–172, 2005.

JAVELLE, A. et al. Ammonium sensing in *Escherichia coli*: Role of the ammonium transporter Amtb and AmtB-GlnK complex formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 8530–8538, 2004.

KANG, G. B. et al. CRYSTALLIZATION AND X-RAY ANALYSIS OF NH₃-DEPENDENT NAD + SYNTHETASE FROM *HELICOBACTER*. v. 10, n. 4, p. 418–421, 2003.

LARONDE-LEBLANC, N.; RESTO, M.; GERRATANA, B. Regulation of active site coupling in glutamine-dependent NAD(+) synthetase. **Nature structural & molecular biology**, v. 16, n. 4, p. 421–429, 2009.

LASKOSKI, K. **CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS NAD SINTETASES (NadE1 e NadE2) DE Herbaspirillum seropedicae**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2010.

LASKOSKI, K. et al. In vitro characterization of the NAD⁺ synthetase NadE1 from *Herbaspirillum seropedicae*. **Archives of Microbiology**, 2016.

LEIGH, J. A; DODSWORTH, J. A. Nitrogen regulation in bacteria and archaea. **Annual review of microbiology**, v. 61, p. 349–77, jan. 2007.

LIANG, L. et al. Effects of overexpression of NAPRTase, NAMNAT, and NAD synthetase in the NAD(H) biosynthetic pathways on the NAD(H) pool, NADH/NAD⁺ ratio, and succinic acid production with different carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 90–96, dez. 2013.

MCDONALD, H. M. et al. Structural adaptation of an interacting non-native C-terminal helical extension revealed in the crystal structure of NAD⁺ synthetase from *Bacillus anthracis*. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 63, n. Pt 8, p. 891–905, 2007.

MEZA, B.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Involvement of indole-3-acetic acid produced by *Azospirillum brasilense* in accumulating intracellular ammonium in *Chlorella vulgaris*. **Research in microbiology**, v. 166, n. 2, p. 72–83, jan. 2015.

MONTEIRO, R. A. et al. *Herbaspirillum* -plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant Soil**, v. 356, p. 175–196, 2012.

MOURE, V. R. et al. Heat stability of Proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step. **Protein expression and purification**, v. 81, n. 1, p. 83–8, jan. 2012.

NEIVERTH, A. et al. Performance of different wheat genotypes inoculated with the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **European Journal of Soil Biology**, v. 64, p. 1–5, 2014.

NINFA, A. J.; JIANG, P. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 2, p. 168–73, abr. 2005.

NOINDORF, L. et al. Characterization of the orf1glnKamtB operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Archives of microbiology**, v. 185, n. 1, p. 55–62, mar. 2006.

NOINDORF, L. et al. Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **BMC microbiology**, v. 11, n. 1, p. 8, jan. 2011.

OLIVARES, F. L. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biol Fertil Soils**, v. 21, p. 197–200, 1996.

PACE, H. C.; BRENNER, C. The nitrilase superfamily: classification, structure and function. **Genome biology**, v. 2, n. 1, p. REVIEWS0001, jan. 2001.

PARK, Y. W.; YEO, H. K.; LEE, J. Y. Structural Analysis of the NH₃-dependent NAD⁺ Synthetase from *Deinococcus radiodurans*. v. 35, n. 9, p. 2863–2866, 2014.

PEDROSA, F. O. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS genetics**, v. 7, n. 5, p. e1002064, maio 2011.

PIOSZAK, A. A.; JIANG, P.; NINFA, A. J. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates the activities of the two-component system transmitter protein NRII by direct interaction with the kinase domain of the transmitter module. **Biochemistry**, v. 39, n. 44, p. 13450–13461, 2000.

RADCHENKO, M. V.; THORNTON, J.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins are ATPases whose activity is regulated by 2-oxoglutarate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 32, p. 12948–53, 6 ago. 2013.

RADCHENKO, M.; MERRICK, M. The role of effector molecules in signal transduction by PII proteins. **Biochemical Society transactions**, v. 39, n. 1, p.

189–194, 2011.

RAO, S. P. S. et al. The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 33, p. 11945–11950, 2008.

REITZER, L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. **Annual review of microbiology**, v. 57, p. 155–76, jan. 2003.

RESTO, M.; YAFFE, J.; GERRATANA, B. An ancestral glutamine-dependent NAD(+) synthetase revealed by poor kinetic synergism. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1794, n. 11, p. 1648–53, nov. 2009.

RIZZI, M. et al. Crystal structure of NH₃-dependent NAD⁺ synthetase from *Bacillus subtilis*. **The EMBO journal**, v. 15, n. 19, p. 5125–5134, 1996.

RODIONOVA, I. A. et al. Metabolic and Bactericidal Effects of Targeted Suppression of NadD and NadE Enzymes in *Mycobacteria*. 2014.

RODRIGUES, T. E. et al. In vitro interaction between the ammonium transport protein AmtB and partially uridylylated forms of the P(II) protein GlnZ. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1814, n. 9, p. 1203–9, set. 2011.

RONCATO-MACCARI, L. D. B. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS microbiology ecology**, v. 45, n. 1, p. 39–47, 1 jul. 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning, A Laboratory Manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANT'ANNA, F. H. et al. The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights. **Journal of molecular evolution**, v. 68, n. 4, p. 322–36, abr. 2009.

SORCI, L. et al. Nicotinamide mononucleotide synthetase is the key enzyme for an alternative route of NAD biosynthesis in *Francisella tularensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 9, p. 3083–8, 3 mar. 2009.

SORCI, L. et al. Quinolinate salvage and insights for targeting NAD biosynthesis in group A streptococci. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 4, p. 726–32, fev. 2013.

SORCI, L.; RUGGIERI, S.; RAFFAELLI, N. NAD homeostasis in the bacterial response to DNA/RNA damage. **DNA repair**, 12 ago. 2014.

STANCEK, M.; SCHNELL, R.; RYDÉN-AULIN, M. Analysis of Escherichia coli nicotinate mononucleotide adenyltransferase mutants in vivo and in vitro. **BMC biochemistry**, v. 6, p. 16, 2005.

SYMERSKY, J. et al. NH₃-dependent NAD⁺ synthetase from Bacillus subtilis at 1 Å resolution. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 58, n. 7, p. 1138–1146, 2002.

TESMET, J. J. G. et al. The crystal structure of GMP synthetase reveals a novel catalytic triad and is a structural paradigm for two enzyme families. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 1, p. 74–86, 1996.

TRUAN, D. et al. A New PII Protein Structure Identifies the 2-Oxoglutarate Binding Site. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 3, p. 531–539, 2010.

VAN HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; BOOGERD, F. C. Nitrogen assimilation in Escherichia coli: putting molecular data into a systems perspective. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 77, n. 4, p. 628–95, 1 dez. 2013.

WANG, J. et al. Effects of increasing the NAD(H) pool on hydrogen production and metabolic flux distribution in Enterobacter aerogenes mutants. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13204–13215, out. 2013.

YAMADA, K. et al. The simultaneous measurement of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Anal Biochem**, v. 352, n. 2, p. 282–285, 2006.

YONG, X.-Y. et al. Enhancement of bioelectricity generation by cofactor manipulation in microbial fuel cell. **Biosensors & bioelectronics**, v. 56, p. 19–

25, 15 jun. 2014.